



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2012

**Paulo Roberto Horta
Sousa**

**Estudo da glicação da transferrina humana por
espectrometria de massa**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2012

**Paulo Roberto Horta
Sousa**

Estudo da glicação da transferrina humana por espectrometria de massa

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica na especificidade de Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica do Doutor André Moreira Neto Silva, Estagiário de Pós-Doutoramento do Departamento de Química e do Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues, Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho aos meus pais.

Agradecimentos

Neste espaço apresento o meu profundo agradecimento às pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a concretização deste trabalho.

Agradeço aos meus orientadores, Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues, e Doutor André Moreira Neto Silva pela disponibilidade, transmissão de conhecimentos e orientação que permitiram o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Cláudia Simões, pela disponibilidade, apoio e boa disposição.

A todos os meus amigos, em especial ao Duarte e à Marta pelo apoio, carinho e incentivo.

À Yenny pelo companheirismo, apoio e encorajamento.

Aos meus pais, que sempre me incentivaram a concretizar os meus objetivos e pelo apoio emocional e financeiro que foi fundamental no decorrer de toda a minha jornada académica. A eles um Muito Obrigado

O júri

Presidente

Doutora Rita Maria Pinho Ferreira
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues
Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor André Moreira Neto Silva
Estagiário de Pós-Doutoramento, do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Cristina Esteves
Investigadora de Pós-Doutoramento do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar da Universidade de Aveiro

Palavras Chave

Glicação, AGEs, diabetes melito, transferrina, ferro.

Resumo

A diabetes melito é uma patologia severa caracterizada pela hiperglicemia. Uma das consequências dos níveis elevados de glucose é a ocorrência de glicação não enzimática nas proteínas. A glicação resulta da formação de bases de Schiff entre aminas livres nas cadeias polipeptídicas e os açúcares redutores em circulação. Estudos anteriores verificaram um aumento considerável da glicação das proteínas do soro, incluindo a transferrina (Trf). Esta proteína é responsável pelo transporte de ferro pelo organismo e a sua glicação leva a uma diminuição da sua capacidade de ligação a este elemento. A alteração funcional da Trf pode levar a uma acumulação de espécies tóxicas de ferro no plasma e como consequência a um aumento dos efeitos deletérios deste metal de transição no organismo. No decorrer deste trabalho foi estudada a glicação *in vitro* da Trf por exposição a diferentes concentrações de D-glucose. A capacidade de ligação ao ferro foi avaliada por espectrofotometria e a espectrometria de massa (nano-HPLC-ESI-Ion Trap-MS/MS) foi utilizada para identificação dos aminoácidos suscetíveis à glicação. As experiências *in vitro* demonstraram que os níveis de glicação aumentam com o aumento do tempo de exposição à D-glucose e da concentração da mesma. A capacidade de ligação ao ferro da Trf encontrava-se também diminuída nas amostras glicadas. Pela análise MS identificaram-se várias lisinas modificadas por glicação. As lisinas 206, 296 e 534, que participam na estabilização da ligação de ferro pela Trf, encontravam-se modificadas. Este resultado permite especular quanto à forma pela qual a glicação inibe ou dificulta a ligação do ferro pela Trf.

Keywords

Glycation, AGEs, diabetes mellitus, transferrin, iron

Abstract

Diabetes *mellitus* is a severe pathology characterized by hyperglycemia. One of the consequences of high glucose is protein glycation. Glycation results from the formation of Schiff bases between the free amines within polypeptide chains and circulating reducing sugars. Previous studies have demonstrated an increase in the level of serum proteins glycation, including transferrin (Trf). Glycation of this protein leads to an impairment in its iron binding capacity. The functional alteration of Trf may lead to the accumulation of plasma toxic iron species and as a consequence to an increase in the deleterious effects of this transition metal in the organism.

Glycated Trf, prepared *in vitro* by incubation with various concentrations of D-Glucose was examined in this study. The iron binding capacity and glycation level were verified by spectrophotometric methods, and mass spectrometry (nano-HPLC-ESI-Ion Trap-MS/MS) respectively. Tandem MS was used to identify the amino acid residues that are susceptible to undergo glycation. The *in vitro* experiments demonstrated that the glycation levels were increased with increased D-glucose concentrations and incubation time. It was also possible to observe that Trf iron binding capacity was impaired by increasing glycation levels. The MS analysis revealed that several lysine residues were modified by glycation. Lysines 206, 296 and 534 (involved in the stabilization of iron binding) were found to be modified, rendering a fructoselysine moiety. These modifications may justify the impairment in iron binding capacity of Trf upon glycation.

Índice

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	DIABETES MELITO	3
2.1	PREVALÊNCIA, CAUSAS E TRATAMENTO DA DIABETES MELITO	7
2.2	TIPOS DE DIABETES MELITO.....	7
2.3	A DIABETES MELITO E O STRESS OXIDATIVO.....	8
3.	GLICAÇÃO	6
3.1	GLICAÇÃO DE PROTEÍNAS NO SORO.....	13
3.2	REAÇÃO DE MAILLARD.....	13
3.3	PRODUTOS AVANÇADOS DE GLICAÇÃO (AGES)	15
4.	CARACTERIZAÇÃO DA GLICAÇÃO PROTEICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSA	13
4.1	APROXIMAÇÃO PROTEÓMICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSA NA ANÁLISE DE PROTEÍNAS.....	19
4.2	ANÁLISE DE PROTEÍNAS GLICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	20
5.	METABOLISMO DO FERRO	25
5.1	METABOLISMO SISTÊMICO DO FERRO	27
5.2	O FERRO E A DIABETES.....	29
5.3	TRANSFERRINA.....	31
5.4	GLICAÇÃO DA TRANSFERRINA.....	32
6.	MATERIAIS E MÉTODOS	33
6.1	REAGENTES.....	35
6.2	GLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA APO- E HOLO-TRANSFERRINA HUMANA.....	35
6.3	QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLICAÇÃO DA APO- E HOLO- TRF HUMANA	36
6.4	AValiação DA CAPACIDADE DE LIGAÇÃO AO FERRO DA APO-TRF HUMANA	36
6.5	ANÁLISE DA TRF GLICADA NÃO DIGERIDA POR MALDI-TOF-MS	36
6.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
7.	RESULTADOS	39
7.1	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA APO- E HOLO-TRF HUMANA.....	41
7.2	ANÁLISE DA APO- E HOLO TRF GLICADA NÃO DIGERIDA POR ESPECTROMETRIA DE MASSA	43
7.3	IDENTIFICAÇÃO DAS MODIFICAÇÕES INDUZIDAS POR GLICAÇÃO NA APO- E HOLO-TRF POR ESPECTROMETRIA DE MASSA TÁNDEM	44
7.4	AValiação DA CAPACIDADE DE LIGAÇÃO AO FERRO DA APO-TRF GLICADA	51
8.	DISCUSSÃO	55
9.	CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS.....	63
10.	REFERÊNCIAS.....	69
11.	ANEXOS.....	81

Índice de ilustrações

Fig. 1 - Formação da base Schiff e rearranjo de Amadori (adaptado de ⁶).....	14
Fig. 2 - Adutos iniciais da glicação em proteínas (adaptado de ⁵⁰).	14
Fig. 3 - Agentes de glicação derivados do α -dicarbonil glioxal formados durante a glicação (adaptado de ⁶).	15
Fig. 4 - Formação da diona de Amadori e da ene-diona de Amadori por desidratação seguida pela formação de uma interligação proteína-proteína (adaptado de ⁶).....	15
Fig. 5 – Esquema da abordagem genérica para identificação e caracterização de proteínas glicadas (adaptado de ⁷⁷).....	22
Fig. 6 - Distribuição de ferro pelo organismo humano em adultos (adaptado de ⁹⁵).....	28
Fig. 7 – Ciclo da transferrina (adaptado de ¹⁰⁰).....	29
Fig. 8 – Concentração de frutose-lisina normalizada à quantidade de proteína na amostra (mol de frutose-lisina por mol de Trf) determinada por ensaio colorimétrico com NBT após incubação com 0, 10, 100, 500 mM de D-glucose durante 7 e 14 dias da a) apo-Trf e b) holo-Trf. * - $P<0,05$; ** - $P<0,01$, *** - $P<0,001$	42
Fig. 9 - Espectros exemplificativos dos espectros obtidos por MALDI-TOF-M com as massas médias dos quadruplicados para a amostra incubada por 14 dias a) sem D-glucose e b) com 500mM de D-glucose	43
Fig. 10 - Estrutura primária da Trf incluindo o péptido sinal (a vermelho) onde estão representadas, a sombreado amarelo, as modificações identificadas após incubação com glucose por 7 dias, com sombreado azul as identificadas após 14 dias e a verde as que foram verificadas em ambos.Com caixas a vermelho estão representados os sítios conservados de ligação ao ferro e a roxo os aminoácidos que estabilizam a ligação do ferro à Trf. Com realce rosa, estão representadas os locais por onde ocorre a alteração conformacional, com realce cinzento os sítios de ligação do ião carbonato e a sublinhado os sítios de interação com o recetor. O subdomínio N1 compreende os resíduos 1-92 e 247-331, o N2 os resíduos 93-246 , o C1 os resíduos 339-425 e por fim o C2 os resíduos 426-572. (sequência adaptada de uniprotKB ID: P02787)	48
Fig. 11 - Representação em <i>cartoon</i> da Trf, onde se encontra representado os lóbulos C e N sob a forma dos seus subdomínios. O subdomínio C1 encontra-se a azul, o C2 a verde, o N1 a castanho e por fim o N2 a roxo. A vermelho estão representados os sítios de ligação do ferro a cinzento os sítios de ligação do ião bicarbonato a rosa os locais por onde ocorre a alteração conformacional, a laranja os aminoácidos que participam na estabilidade da ligação Trf-Fe, a preto o “linker” que liga os dois lóbulos, a azul os locais de interação com o RTrf e por fim a amarelo os resíduos amino acídicos modificados por glicação observados após pré incubação com d-Glucose. (adaptado de ¹²⁷ PDB ID 2HAU editada no Protein Workspop RCBS PDB ¹²⁸).....	49
Fig. 12 - Representação em <i>cartoon</i> da Trf com ampliação das cavidades onde se liga o ferro. As lisinas modificadas após incubação com D-glucose (0, 10, 100, 500 mM)	

encontram-se representadas a amarelo, o subdomínio C1 encontra-se a azul, o C2 a verde, o N1 a castanho, o N2 a roxo. A vermelho estão representados os sítios de ligação do ferro a cinzento os sítios de ligação do íão carbonato, a rosa as dobradiças moleculares, a azul os sítios de ligação ao RTfr e a laranja os aminoácidos que participam na estabilidade da ligação Trf-Fe (adaptado de ¹²⁷ PDB ID 2HAU editada no Protein Worksop; RCSB PDB ¹²⁸)..... 50

Fig. 13 – Comparação da capacidade quelante de ferro da Trf durante 90 min a 465 nm, após incubação com 0 (azul), 10 (verde), 100 (vermelho) e 500 (preto) mM de glucose durante a) 7 dias e b) 14 dias. A estatística comparativa para as diferentes condições de incubação apresentou significado estatístico com $P < 0,05$ 51

Fig. 14 - Comparação da saturação máxima em percentagem após 90 minutos de incubação com Fe:NTA da apo-Trf incubada com 0, 10, 100, 500 mM de D-glucose durante 7 e 14 dias. * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$, *** - $P < 0,001$ 52

Fig. 15 – Comparação da velocidade inicial da ligação de ferro à Trf da apo-Trf incubada com 0, 10, 100, 500 mM de glucose durante 7 e 14 dias. * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$, *** - $P < 0,001$ 53

Índice de tabelas

Tabela 1 – Desvios de massa associados a adutos de glicação envolvendo a lisina 38

Tabela 2 - Número de modificações observado para a apo- e holo-Trf incubadas durante 7 e 14 dias com 0, 10, 100, 500 mM de D-glucose determinadas por MALDI-TOF-MS 44

Tabela 3 - Modificações encontradas após análise dos péptidos trópticos obtidos a partir das amostras de transferrina incubadas com glucose (0, 10, 100, 500) durante 7 e 14 dias por HPLC-ESI-Ion Trap-MS/MS; onde PIR corresponde a uma modificação por adição de uma pirralina; CEL -carboxi-etil-lisina; FL-H₂O- Frutoselisina com uma desidratação, FL-2H₂O- Frutoselisina e por fim FL-frutoselisina com uma desidratação. As modificações que se encontram marcadas com * correspondem a modificações identificadas de forma indireta. 46

Lista de abreviações

AGE	Produtos avançados de glicação (Advanced glycation end products)
ATP	Trifosfato adenosina
BAC	Cromatografia de afinidade com ácido borónico (Boronic acid chromatography)
CID	Dissociação induzida por colisão (Collision induced dissociation)
DMF	1-Deoxy-1-morpholino-D-fructose
DMT1	Transportador de metal divalente 1 (Divalent metal transporter)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ESI	Ionização por electrospray (Electrospray ionization)
GSH	Glutathione
Hb1AC	Hemoglobina glicada
HCP1	Heme receptor protein
HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho (High performance liquid chromatography)
ICR	Analisador de ressonância ciclotrónica de iões (Ion cyclotron resonance)
IDF	Federação Internacional da Diabetes (International diabetes federation)
LC	Cromatografia líquida (Liquid chromatography)
MALDI	Ionização/dessorção por laser assistida por matriz (Matrix assisted laser desorption ionization)
MS	Espectrometria de massa
MS ⁿ	Espectrometria de massa <i>tandem</i>
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NBT	Nitroblue tetrazolium; N5514)
NTA	Ácido nitrilotriacético (Nitrilotriacetic acid)
NTBI	Ferro não ligado a transferrina (Non-transferrin-bound-iron)
PA	Produto Amadori
Q	Quadrupolos
RNS	Espécies reativas de azoto
ROS	Espécies reativas de oxigénio
RTfr	Recetor da transferrina
SOD	Superóxido dismutase
TI	Trappas iónicas (Ion trap)
TOF	Tempo de voo (Time of flight)
Trf	Transferrina
OMS	Organização Mundial de Saúde (World health organization)

1. Introdução

A diabetes melito é uma patologia caracterizada pela ocorrência de hiperglicemia, geralmente associada a uma resistência à ação da insulina ou deficiência na sua produção. A exposição à hiperglicemia leva ao aumento do stress oxidativo devido à formação de glico-oxidantes e à glicação proteica.¹ O stress oxidativo é caracterizado por uma produção excessiva de espécies oxidantes (ROS e RNS) e uma diminuição nas defesas antioxidantes do organismo.² Estas espécies oxidantes são o produto normal do metabolismo celular, e participam em vários processos biológicos, no entanto, quando presentes em excesso estas espécies podem reagir com lípidos celulares, proteínas e DNA levando à alteração das suas funções.^{2, 3} A glicação é um outro fator associado à hiperglicemia e compreende a formação de adutos (bases de Schiff) entre açúcares redutores (ex. glucose) e grupos amina livres das proteínas. Estas sofrem rearranjos tornando-se em estruturas mais estáveis, os produtos de Amadori. Estes após desidratações, ciclizações, oxidações e rearranjos originam produtos avançados de glicação (AGEs). Os produtos de Amadori e os AGEs podem induzir modificações nas proteínas levando a alterações funcionais.⁴⁻⁶

Vários estudos verificaram que durante a diabetes melito ocorre um aumento dos níveis do íão férrico no organismo relacionando-a assim com a homeostase do ferro.^{7, 8} A Trf desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase do ferro, ligando o ferro livre no plasma e distribuindo-o pelo organismo.⁹ A Trf em indivíduos normais possui uma saturação de cerca 30%, e estudos anteriores verificaram que no decorrer da diabetes, a variação da saturação de Trf não é significativa.¹⁰ A ocorrência de espécies de ferro não ligado à Trf (NTBI – Non-transferrin bound iron) é característica de patologias com sobrecarga de ferro.^{11, 12} Nestes casos esta ocorrência pode ser explicada pela saturação total da Trf.¹³ No entanto também já foi verificada a ocorrência de NTBI em patologias onde a Trf não se encontra saturada.^{14, 15} Van Campenhout *et al.* não verificou aumento de NTBI nos pacientes diabéticos.¹⁶ No entanto, Sulieman *et al.* e Lee *et al.* verificaram esta ocorrência na diabetes melito.^{17, 18} Tendo em conta a deteção de NTBI apesar da saturação da Trf não se encontrar significativamente alterada, prevê-se uma alteração funcional da Trf devida a danos glico-oxidativos. A verificação desta alteração foi conseguida por estudos que verificavam um aumento na glicação da Trf em pacientes diabéticos. Estudos de glicação *in vitro* demonstraram que esta modificação não enzimática pode reduzir a capacidade de ligação ao ferro pela Trf. Contudo nenhum estudo anterior apresenta o mecanismo pelo qual a glicação promove a diminuição funcional da Trf. A

caracterização estrutural por espectrometria de massa permitiu a identificação dos resíduos glicosilados, conseguindo-se desta forma prever as alterações estruturais que levam à diminuição da capacidade de ligação de ferro.

2. Diabetes melito

2.1 Prevalência, causas e tratamento da diabetes melito

De acordo com a Organização Mundial de Saúde e a Federação Internacional da Diabetes (IDF) a diabetes melito afeta mais de 170 milhões de indivíduos. Só no continente europeu 33 milhões de pessoas com idade compreendida entre os 20 e os 79 anos (cerca de 8,4 % da população) sofrem com esta doença.

Esta patologia é caracterizada pela ocorrência de hiperglicemia, causada por uma deficiente secreção e/ou ação da insulina endógena. O motivo principal para a diminuição na secreção de insulina é a autodestruição das células β , enquanto as causas responsáveis pela resistência à ação desta hormona são a obesidade, o envelhecimento, hiperglicemia, níveis elevados de ácidos gordos no sangue e tecidos e ainda hereditariedade.^{19, 20} Para além dos sintomas comuns à hiperglicemia (sede, poliúria e perda de peso), a exposição prolongada provoca doenças cardiovasculares, cegueira, falha renal, necrose celular e acidentes vasculares cerebrais.²¹

O diagnóstico da diabetes melito é efetuado através de quatro testes maioritariamente relacionados com os níveis de glucose no sangue (os níveis normais em jejum variam entre 4,0 – 5,5 mmol/l).²² 1) Medição da glicose plasmática em jejum ($\geq 7,0$ mmol/l); 2) Medição da glicose nos pontos de jejum e de 2h após sobrecarga oral de 75g de glicose (teste oral de tolerância à glicose $\geq 11,1$ mmol/l); 3) Determinação da hemoglobina glicada ($\geq 6,5\%$) e 4) em pacientes com hiperglicemia ou crises hiperglicémicas os níveis de glicose plasmática casual ($\geq 11,1$ mmol/l).^{19, 20}

2.2 Tipos de diabetes melito

Existem vários tipos de diabetes; tipo 1, 2, gestacionais e outros tipos específicos. O tipo 1 está relacionado com fatores genéticos, o tipo 2 está relacionado com a obesidade e a vida sedentária (atualmente o mais comum) os diabetes gestacionais que ocorrem de forma pontual durante a gravidez, e por fim outros tipos específicos que são causados por defeitos genéticos ou induzidos por drogas, infeções, etc.¹⁹

A **diabetes melito tipo 1** é caracterizada por défice ou ausência de insulina devido à destruição irreversível das células β das ilhotas de Langerhans, e tem uma forte componente genética.²¹ O tratamento deste tipo de diabetes é conseguido com a injeção subcutânea de insulina.²³ A associação americana da diabetes subdividiu este tipo de

diabetes em dois: - tipo 1A, onde se verifica ausência absoluta de insulina, e a destruição das células β é mediada por processos autoimunes; - tipo 1B, onde os indivíduos apresentam sinais de diabetes tipo 1 mas não se verificam desordens autoimunes e a carência de insulina é variável.¹⁹

A **diabetes melito tipo 2** resulta principalmente da resistência à insulina causada por uma combinação de fatores genéticos com o estilo de vida.²⁴ Sendo assim, os efeitos adversos deste tipo de diabetes são atenuados adquirindo um estilo de vida saudável, ou quando necessário recorrendo a medicamentos ou injeções de insulina.²⁵ Pacientes com este tipo de diabetes apresentam duas condições distintas:

- Desenvolvimento de resistência à insulina – Verifica-se uma resposta diminuída à insulina por parte dos tecidos hepáticos, muscular e adiposo aquando do aumento dos valores de glicemia. Ao desenvolver resistência ao estímulo da insulina, estes tecidos apresentam uma menor taxa de absorção de glucose. Adicionalmente o fígado encontra-se incapaz de regular os níveis de degradação do glicogénio e libertação de glucose para a circulação.
- Funcionamento anormal das células β – Seria de esperar que altos níveis de glucose levassem ao aumento dos níveis de insulina, o que por vezes não se verifica. Torna-se então implícito que as células β não estão a compensar a resistência a insulina.²⁴

A diminuição na sensibilidade à insulina deve-se a fatores genéticos, idade, dieta, alguns medicamentos, obesidade e ao aumento de tecido adiposo na área abdominal. Os mecanismos que provocam o mau funcionamento das células β não se encontram bem caracterizados.²⁶ A resistência à insulina e/ou a diminuição da sua secreção provocam uma situação de hiperglicemia, pois a absorção de glucose por parte das células encontra-se diminuída.²⁷ A exposição a uma concentração elevada de glucose por sua vez promove um aumento do stress oxidativo devido à auto-oxidação da glucose e da glicação não enzimática de proteínas.²⁸

2.3 A diabetes melito e o stress oxidativo

A diabetes melito é caracterizada por um aumento do stress oxidativo. O stress oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre espécies oxidantes e os mecanismos de remoção ou reparação num organismo biológico.³ Grande parte dos danos oxidativos que ocorrem em biomoléculas (lípidos, proteínas e DNA) devem-se à

ação de espécies parcialmente reduzidas como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxilo (HO^{\bullet}), o peroxinitrilo, peróxido de hidrogénio (H_2O_2), e os radicais de azoto (NO_2^{\bullet} , etc.)²⁹ As espécies reativas predominantes nos seres biológicos são as derivadas de oxigénio, espécies reativas de oxigénio (ROS-reactive oxygen species) e as derivadas de azoto, espécies reativas de azoto (RNS- reactive nitrogen species)^{2, 30} Estas espécies reativas são produtos normais do metabolismo celular, e medeiam vários processos fisiológicos como a regulação da tensão contrátil vascular, funcionam como sensores de oxigénio e regulam funções que são controladas pela concentração de oxigénio, aumentam a transdução de vários recetores membranares e por fim, mantêm o equilíbrio redox desencadeando respostas ao stress oxidativo.²

Os sistemas biológicos desenvolveram formas de minimizar e reverter os efeitos de toxicidade dos ROS, ou seja, mecanismos preventivos, mecanismos de reparação, defesas físicas e defesas antioxidantes.³¹ As defesas antioxidantes incluem agentes que removem cataliticamente radicais livres, proteínas que minimizam a disponibilidade de pro-oxidantes (ex. iões ferro, iões cobre e o grupo heme), proteínas que protegem as biomoléculas por outros mecanismos (ex. as proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*) que corrigem o enrolamento proteico incorreto (*misfold*) e que medeiam a autofagia³²) e agentes de baixo peso molecular capazes de neutralizar os radicais livres (ex. ácido ascórbico, α -tocoferol).³³

Vários mecanismos estão envolvidos no aumento do stress oxidativo verificado na diabetes, levando diretamente à produção de espécies reativas de oxigénio ou, de forma indireta, comprometendo a homeostase redox celular.³⁴ A exposição à hiperglicemia na diabetes melito implica um aumento no metabolismo oxidativo da glucose, e como consequência o acréscimo na produção mitocondrial de $O_2^{\bullet-}$.³⁵ Para além da exposição a níveis elevados de glicemia, a formação de ROS na diabetes é também promovida pelo aumento de ácidos gordos livres, devido ao aumento do desacoplamento mitocondrial e à β -oxidação.³⁶ Adicionalmente à superprodução de ROS verificada a nível mitocondrial, na diabetes o aumento do stress oxidativo celular resulta da autooxidação da glucose e de alterações metabólicas promovidas pelo excesso deste nutriente. A via poliol(sorbitol) é uma das vias alternativas da glicólise, que ocorre em células que não necessitam de insulina para internalizar glucose (ex. células da retina, rins e tecido nervoso). Por esta via a glucose é reduzida a sorbitol pela aldose reductase à custa de uma molécula de NADPH. De seguida a sorbitol desidrogenase oxida o sorbitol a frutose reduzindo uma molécula de NAD^+ , a frutose pode então ser

fosforilada a frutose-6-fosfato e voltar à via da glicólise. Em situações de hiperglicemia, ocorre um aumento de produtos desta via e da depleção de NADPH, promovendo por exemplo, uma redução na regeneração de antioxidantes pela GSH.^{34, 36} Uma outra alteração metabólica consiste no aumento do fluxo de glicose pela via da hexosamina onde a frutose-6-fosfato é convertida a glucosamina-6-fosfato pela glutamina:frutose-6-fosfato aminotransferase. O produto final deste mecanismo é o UDP-N-acetilglucosamina, que participa na glicosilação de algumas proteínas.³⁴ Por fim, a glucose pode sofrer autooxidação na presença de metais de transição e gerar espécies reativas como $O_2^{\bullet -}$, H_2O_2 , HO^{\bullet} e dicarbonilos que podem reagir com proteínas levando a formação de AGE's.³⁷

3. Glicação

3.1 Glicação de proteínas no soro

As modificações covalentes enzimáticas, como a alquilação, glicosilação, fosforilação, hidroxilação e acetilação são importantes na regulação da homeostase celular e modulação da função e estrutura proteica. Estas modificações são específicas, ao contrário da glicação que é uma modificação não enzimática.³⁸ A glicação (ou glicosilação não enzimática) é uma das modificações pós-traducionais (PTM – post translational modification) de proteínas mais comum, e consiste na ligação covalente de um açúcar redutor a um grupo amina livre. Esta PTM pode levar à alteração estrutural proteica promovendo assim a sua disfuncionalidade. As aminas livres em proteínas encontram-se nas cadeias laterais dos aminoácidos (lisina, arginina e histidina), como o grupo ϵ -amina da lisina e o grupo α -amina de um aminoácido N-terminal.^{4, 39}

De uma forma geral, grupos de aminoácido com menor pKa são mais reativos para a glicação devido à sua maior nucleoficidade.⁴⁰ Por outro lado os locais de reação devem estar acessíveis ao solvente. Nas proteínas, a lisina e a arginina são resíduos carregados positivamente, pouco hidrofóbicos e geralmente acessíveis ao solvente.⁴¹ A reação de glicação pode ser globalmente descrita como a formação de uma base de Schiff reversível, seguida de um rearranjo num produto de Amadori (PA) e finalmente, quando as proteínas têm um maior tempo de meia-vida ocorre formação de produtos avançados de glicação (AGE's) por múltiplas desidratações e rearranjos.⁴

3.2 Reação de Maillard

L. C. Maillard (1912) foi o primeiro a estudar, sob condições definidas, a reação não enzimática entre um açúcar redutor e os grupos amina de aminoácidos, péptidos e proteínas, onde verificou a formação de pigmentos castanhos e interligações entre proteínas.⁴² No entanto só a partir dos anos 70, com os estudos da hemoglobina glicada e a significância dos processos de Maillard na diabetes e no envelhecimento, é que se começou a dar importância a estas reações *in vivo*.⁴³⁻⁴⁶

Na fase inicial da reação de Maillard são formados vários produtos, que formam adutos instáveis, as bases de Schiff.⁵ A base de Schiff compreende o aduto formado quando um açúcar reage com um grupo amina livre, como por exemplo o grupo ϵ -amina de um resíduo de lisina de uma proteína. Neste processo a ligação dupla carbono-

oxigênio do açúcar é transformado numa dupla ligação carbono azoto com a amina livre (Fig. 1).⁶

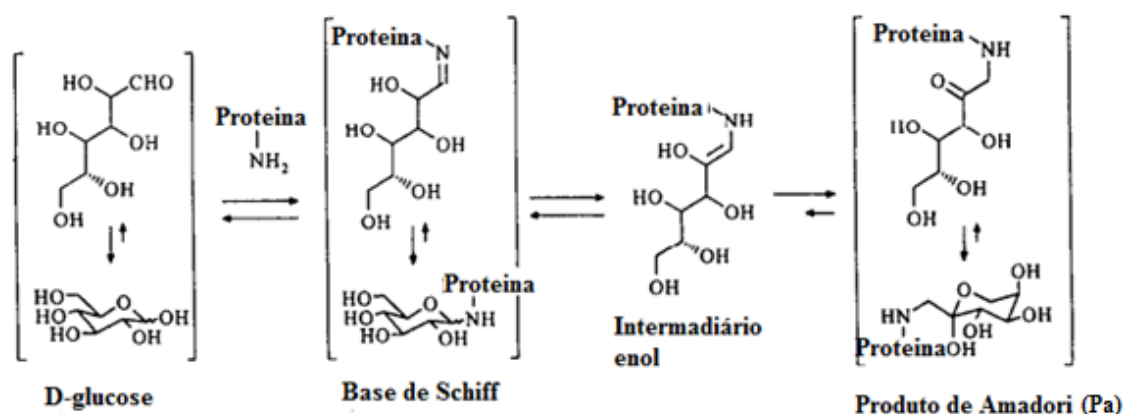


Fig. 1 - Formação da base Schiff e rearranjo de Amadori (adaptado de ⁶).

Esta reação é altamente reversível e atinge um equilíbrio com a glicose do plasma em apenas algumas horas.⁴⁷ Qualquer açúcar redutor pode iniciar a reação de glicação *in vivo*. Contudo, devido à maior abundância natural da glicose no sangue humano, a maior parte dos estudos centra-se no estudo da glicação iniciado por este açúcar.⁴⁸ Estudos efetuados com Hb1AC (hemoglobina glicada) verificaram que ocorria um rearranjo da base de Schiff, conhecido como rearranjo de Amadori. Esta descoberta levou a que as proteínas com PAs e o seu processo de formação passassem a ser denominados como proteínas glicadas e glicação, respetivamente.^{6, 44} A base de Schiff pode dissociar-se ou sofrer um rearranjo lento para formar compostos cineticamente mais estáveis, mas ainda assim reversíveis (os PA) (Fig. 2), via um intermediário enol de cadeia aberta. O processo de dissociação do aduto é muito mais lento originando uma acumulação de produtos Amadori⁴⁹. Os PAs encontram-se em equilíbrio com a concentração de glicose, devido a sua reversibilidade e, desta forma a sua concentração aumenta na presença de elevados níveis de glicose.⁵

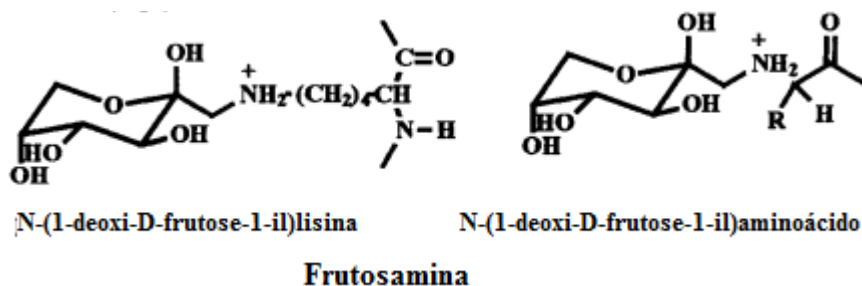


Fig. 2 - Adutos iniciais da glicação em proteínas (adaptado de ⁵⁰).

Os PAs são assim a primeira alteração estável que ocorre no processo de glicação proteica. Estes formam-se geralmente no grupo ϵ -amina da lisina dos resíduos de lisina ou arginina, formando o aduto frutose-lisina.⁵¹ Contudo, o maior contributo para as complicações diabéticas advém da formação de produtos de glicação pós-Amadori que não são reversíveis (AGE's).⁵² A acumulação destes adutos promove modificações estruturais e funcionais em proteínas e enzimas, levando à alteração da sua atividade biológica, como tem sido demonstrado em diversos estudos^{53, 54}

3.3 Produtos avançados de glicação (AGEs)

Na glicação, os AGE's são formados por progressivas desidratações, ciclizações, oxidações e rearranjos dos PAs e, ao contrário dos PAs, a sua formação é irreversível.⁵ Os PA's podem sofrer quebra da sua forma enol formando compostos α -dicarbonil reativos como a 3-deoxiglucosona, 2-oxopropanol e glioxal (Fig. 3) compostos estes com grupos carbonilos que podem voltar a reagir com proteínas. O produto de Amadori pode ainda sofrer desidratações sequenciais nas posições 4 e 5, produzindo o 1-amino-4-deoxy-2,3-diona (diona de Amadori) e uma diona insaturada, a ene-dione de Amadori, respetivamente. Esta diona insaturada reage com o nucleófilo da proteína formando uma interligação proteína-proteína (Fig. 4).⁶

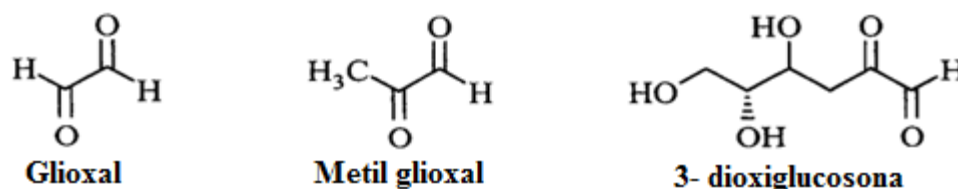


Fig. 3 - Agentes de glicação derivados do α -dicarbonil glioxal formados durante a glicação (adaptado de 6).

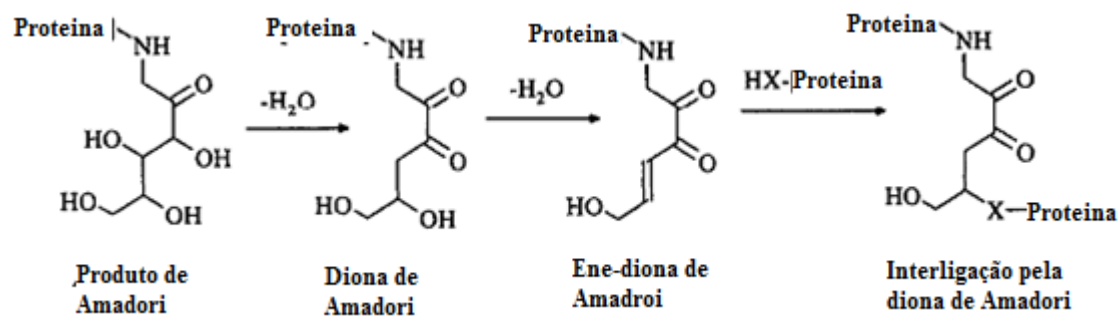


Fig. 4 - Formação da diona de Amadori e da ene-diona de Amadori por desidratação seguida pela formação de uma interligação proteína-proteína (adaptado de 6).

O processo de formação dos AGEs não é completamente compreendido, sabe-se que estes incluem interligações proteicas (*crosslinks*) assim como estruturas não interligadas, e que muitos incorporam cromóforos ultravioleta-visível e/ou fluorescentes.⁶ Existem alguns que se encontram bem caracterizados e que se apresentam em altas concentrações em diabéticos, como a pirralina, a pentosidina e a N-carboximetil-lisina.⁵⁵

4. Caracterização da glicação proteica por espectrometria de massa

4.1 Aproximação proteômica por espectrometria de massa na análise de proteínas

A proteômica ocupa-se do estudo das proteínas e das suas interações a nível celular e sistémico. Devido à alta complexidade dos proteomas celulares e à baixa abundância de algumas proteínas a análise proteômica requer a utilização de técnicas com elevada sensibilidade e precisão.⁵⁶ A espectrometria de massa (MS – Mass spectrometry) tem vindo a ser amplamente utilizada na proteômica já que permite a identificação de proteínas com base no seu peso molecular, identificação de novas proteínas por sequenciação peptídica e ainda, a identificação de modificações PTM que geralmente promovem desvios de massa conhecidos. Esta técnica possui elevada sensibilidade (na ordem dos femtomole) e, resolução permitindo a distinção de pequenas variações de massa e a análise de misturas complexas.⁵⁶⁻⁵⁸

Apesar de existirem várias conformações possíveis para um espectrómetro de massa todos têm o mesmo propósito, a separação de átomos ou moléculas ionizadas recorrendo a sua razão massa-carga (m/z). Estes baseiam-se todos no mesmo princípio funcional, sendo constituídos por uma fonte de ionização, responsável por ionizar as moléculas; seguido de um analisador de massa, que separa os iões com base na sua razão massa carga (m/z); por fim um detetor, que deteta os iões e mede a sua razão m/z produzindo um sinal cuja intensidade está relacionado com o número de iões que chegam ao detetor. Dado que se formam iões e que estes têm de percorrer um determinado espaço, os espectrómetros têm de se encontrar em vácuo de forma a evitar colisões dos iões com moléculas de ar.⁵⁷ Frequentemente, utiliza-se um método de separação como o micro- ou nano-HPLC para separação e purificação da amostra, sendo este de preferência *online* com o espectrómetro de massa para evitar perdas de amostra.⁵⁹

As técnicas de ionização/desorção por laser assistida por matriz (MALDI – matrix-assisted laser desorption/ionization) e a de ionização por electrospray (ESI – electrospray ionization) são as mais utilizadas para a análise de proteínas. Estes métodos de ionização possuem um elevado limite de massa e são técnicas ditas “suaves”, permitindo a produção de iões intactos e estáveis de moléculas como proteínas, ácidos nucleicos, ou até complexos ligados covalentemente. As técnicas alternativas, como o impacto eletrónico, a ionização química e fotoionização causam fragmentação extensa originando espectros complexos e de difícil análise.^{60, 61}

O método de ionização MALDI está geralmente associada ao analisador tempo de voo (TOF). O método de ionização ESI por outro lado encontra-se associado a vários analisadores como as trapas iónicas (TI), quadrupolos (Q) e ao analisador de ressonância ciclónica de iões (ICR – ion cyclotron resonance). Na proteómica recorre-se usualmente a MS *tandem*, e para isso são utilizados vários analisadores, assim como varias combinações de analisadores (instrumentos híbridos).^{62, 63} As configurações usualmente utilizadas consistem em trapas iónicas (QIT: trapas de iões 3D e LIT: trapas de iões lineares), triplo quadrupolo (TQ) e instrumentos híbridos (LTQ-Orbitrap, LTQ-FTICR, Q-TOF e IT-TOF).⁶⁴⁻⁶⁹ As trapas iónicas destacam-se neste campo devido à sua versatilidade, rapidez dos varrimentos e capacidade de MS *tandem* (MSⁿ).⁶²

4.2 Análise de proteínas glicadas por espectrometria de massa

A identificação e caracterização dos produtos de glicação não enzimática de proteínas requer a utilização de técnicas analíticas com elevada resolução, sensibilidade e seletividade. Inicialmente, devido à alteração da cor observada no decorrer desta reação, foram utilizadas técnicas espectrofotométricas.⁷⁰ Estas técnicas permitem seguir a reação de glicação e verificar os níveis de glicação dos compostos de interesse, no entanto, não permitem uma caracterização estrutural dos produtos de glicação. As técnicas espectrofotométricas são ainda utilizadas, mas devido à sua baixa especificidade encontram-se geralmente associadas a técnicas separativas de elevada especificidade como a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC – high performance liquid chromatography).⁷¹ De forma a superar estas limitações surge a MS, ferramenta esta que tem vindo a ser amplamente utilizada para análise e caracterização de produtos de glicação.⁷²⁻⁷⁵

Inicialmente, os estudos focaram-se na análise quantitativa do nível de glicação em proteínas específicas por MALDI-MS. Os resultados *in vitro* e *in vivo* providenciaram evidências da associação entre a glicação e condições patológicas como a diabetes.^{76, 77} O produto de Amadori (formação do aduto frutose-lisina) promove um desvio de massa de 162 Da. A partir desta variação é possível determinar o número médio de adutos formados na proteína glicada, por comparação da sua massa total com a massa da mesma proteína não glicada.⁷⁸ No entanto, *in vivo*, esta conclusão pode ser errada pois estes desvios de massa podem ocorrer devido à glicosilação enzimática.⁷⁹

Esta aproximação era um pouco limitada e não permitia a caracterização da glicação. A caracterização da glicação proteica é geralmente conseguida recorrendo a MSⁿ com uma abordagem “*bottom-up*”, onde a amostra é digerida com enzimas proteolíticas (ex. Tripsina, Glu-C, etc.) que clivam a amostra em locais específicos. Os péptidos obtidos são analisados recorrendo a técnicas separativas e a MSⁿ (Fig. 5).^{62, 78, 80-83}

Seguindo a abordagem genérica esquematizada na Fig. 5, o passo inicial consiste na separação das proteínas glicadas. Os métodos de separação para proteínas glicadas implementam passos altamente seletivos tanto a nível proteico como a nível peptídico (pós-digestão). Para isso são utilizados métodos cromatográficos utilizando ácidos borónicos como ligandos em cromatografia de afinidade (BAC – boronic acid chromatography) para a purificação das glicoproteínas.⁸⁴⁻⁸⁷ Esta metodologia baseia-se na esterificação entre o ligando boronato e os compostos cis-diol (o aduto de glucose) sob condições alcalinas tornando assim esta técnica seletiva para proteínas glicadas.⁸⁸

A digestão enzimática é um dos passos críticos nesta abordagem, pois são obtidos os fragmentos a partir dos quais é obtida a informação sobre os sítios de glicação. Lapolla *et al.* verificou *in vitro*, com albumina do soro humano, que a digestão trípica desta proteína glicada era mais difícil, originando uma menor abundância de péptidos obtidos quando comparado com o número de péptidos da proteína não glicada. Esta ocorrência encontra-se relacionada com o facto de as lisinas estarem protegidas pelas moléculas de açúcar.⁸⁹ A digestão de proteínas glicadas origina uma mistura de péptidos glicosilados e péptidos não glicosilados.^{89, 90}

O passo posterior consiste no fracionamento dos péptidos obtidos, levando assim ao aumento na resolução aquando da análise por espectrometria de massa. A separação dos péptidos é conseguida por cromatografia líquida (LC) de fase reversa. Esta técnica pode estar *online* com espectrómetros com fonte de ionização ESI, APCI (ionização química à pressão atmosférica) e por fim *offline* com sistemas MALDI com aplicador de amostras robotizado.⁷⁷ Zang *et al.* para além de LC testou com sucesso a utilização de cromatografia de afinidade com boronato para enriquecimento dos péptidos glicosilados, por separação dos não glicosilados.⁹¹ Por fim, após a análise por MS, as sequências de íons fragmento obtidas por regras de clivagem apropriadas, são comparados bioinformaticamente com sequências proteicas contidas em bases de dados *online* como a Swiss-Prot e as bases disponíveis no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) ou criadas internamente.⁹²

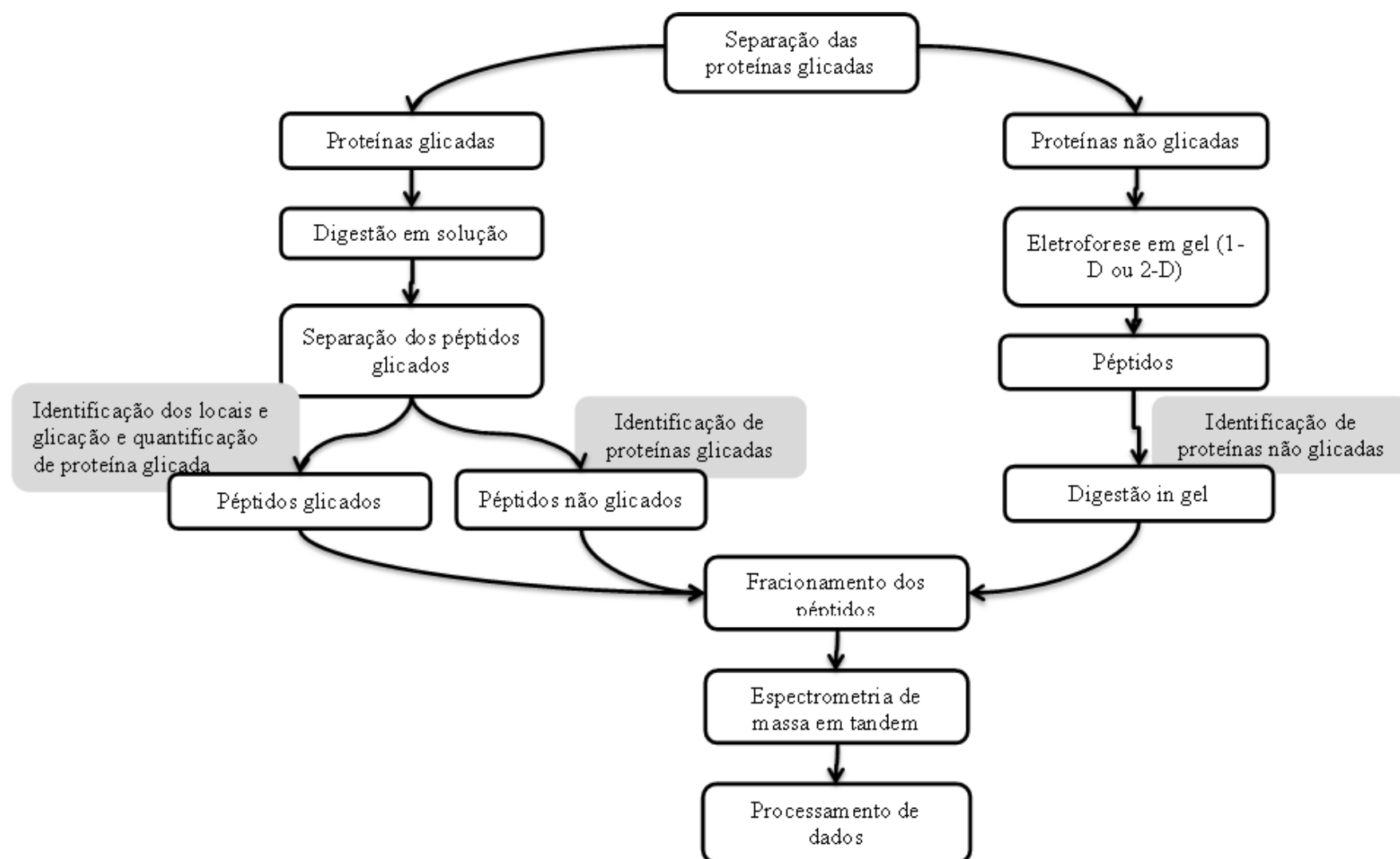


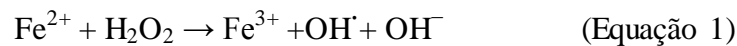
Fig. 5 – Esquema da abordagem genérica para identificação e caracterização de proteínas glicadas (adaptado de ⁷⁷)

A MS recorre à fragmentação do ião molecular de interesse; sendo o ESI e o MALDI técnicas de ionização “suaves” é necessário fornecer energia para promover a quebra da espécie em estudo. A técnica de dissociação induzida por colisão (CID – collision induced dissociation) é a mais comum, e tem por base a colisão entre os iões e um gás inerte.⁹³ No entanto existem alguns inconvenientes com a sequenciação de péptidos glicosados por CID. Durante o CID dos iões de péptidos glicosados, ocorre dissociação preferencial do aduto de Amadori, levando a uma fraca produção de iões da cadeia principal do péptido. Desta forma, iões correspondentes a várias perdas neutras poderão dominar os espectros de massa, o que dificulta a identificação de sequências peptídicas e locais de glicação.^{89, 91} As perdas características de péptidos glicosados correspondem a uma, duas, três ou quatro desidratações, a três desidratações com HCHO e ainda à perda do próprio aduto de Amadori ($C_6H_{10}O_5$). A ocorrência de uma ou duas desidratações ocorre em outros péptidos, no entanto as restantes são pouco comuns.⁸⁹

5. Metabolismo do ferro

5.1 Metabolismo sistémico do ferro

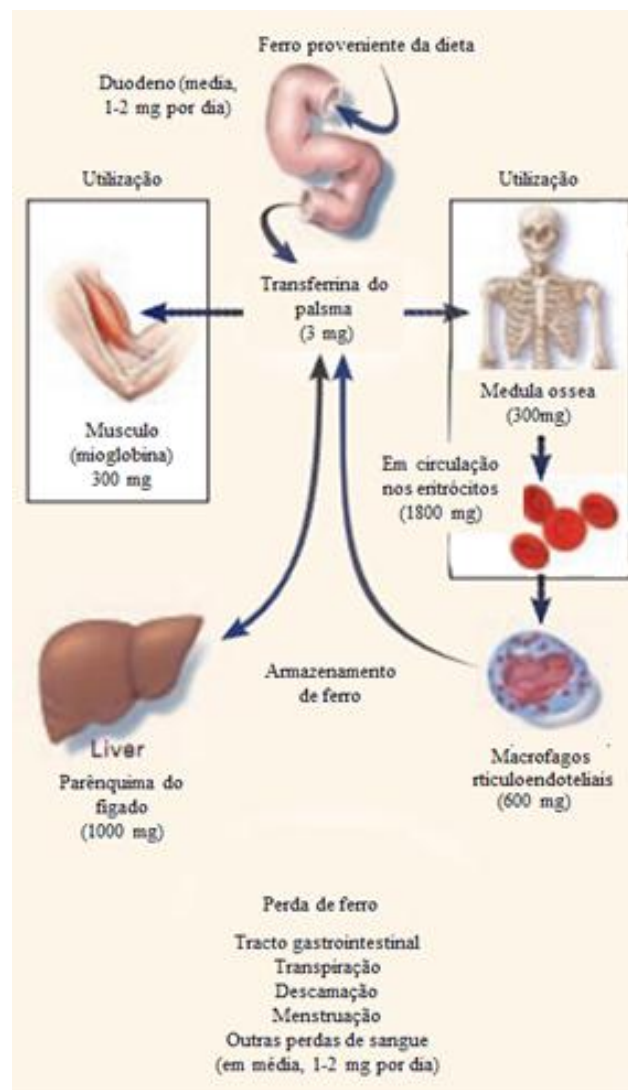
O ferro é um elemento essencial que se encontra envolvido em vários processos essenciais à vida, incluindo transporte de oxigénio, metabolismo energético e síntese de DNA. A elevada flexibilidade das suas propriedades físico-químicas permitem-lhe variar o seu estado de oxidação, potencial de redução e configuração de spin eletrónico em resposta a diferentes ambientes. No entanto é necessário manter uma homeostase controlada deste ião pois, em excesso, pode tornar-se um pró-oxidante através da reação de Fenton (Equação 1).⁹⁴



Um indivíduo adulto saudável possui no seu organismo 4-5 mg de ferro distribuído de uma forma rigorosa. Este ião encontra-se incorporado nos hepatócitos, nos músculos, nos macrófagos do sistema reticuloendotelial mas é maioritariamente encontrado na hemoglobina dos eritrócitos maduros ou de precursores de eritrócitos (Fig. 6). Diariamente são requeridos cerca de 20 mg de ferro para a síntese de novos eritrócitos. Contudo, apenas são absorvidas 1-2 mg de ferro, pelo que a restante quantidade é reciclada da degradação de eritrócitos senescentes. Esta reciclagem é conseguida por ação dos macrófagos reticuloendoteliais que fagocitam os eritrócitos senescentes, catabolizam a hemoglobina e excretam o ferro para a corrente sanguínea onde pode ser recolhido pela Trf de forma a ser reutilizado. O fígado constitui-se como a principal reserva de ferro, este órgão tem acesso direto ao ferro absorvido e funciona como regulador dos níveis deste ião em circulação. A redistribuição do ferro pelos diferentes órgãos é efetuada pela Trf do soro humano. As 3 mg de ferro, existentes no plasma de um adulto saudável, encontra-se todo ligado à Trf e está sujeito a um elevado *turnover*.⁹⁵

A homeostase do ferro é mantida por uma distribuição controlada do ferro pelo organismo e por parte do duodeno, que absorve o necessário para repor as perdas diárias. O organismo humano não possui nenhum mecanismo regulador de excreção deste micronutriente, pelo que o equilíbrio é principalmente controlado ao nível da absorção intestinal.⁹⁶ Esta absorção ocorre pelos enterócitos, maioritariamente na porção proximal do duodeno. O ferro proveniente da dieta encontra-se na forma férrica (Fe^{3+}), tendo de ser reduzido à sua forma ferrosa (Fe^{2+}) para ser absorvido, o que é conseguido de forma química (ex. Ácido ascórbico durante a digestão) ou por ação de redutases férricas que se encontram na membrana do enterócito. Após a redução, o

transporte transmembranar é mediado pelo DMT1 (Divalent metal transporter). Posteriormente o ferro pode ser armazenado sob a forma de ferritina ou transferido pela membrana basolateral para o plasma através da ferroportina. Depois de atravessar a membrana vasolateral do enterócito, o ferro é re-oxidado por uma ferroxidase (haefastina) formando íons férricos que por sua vez se ligam à Trf.⁹⁷ Já o mecanismo de absorção do grupo heme não se encontra completamente descrito, sabe-se apenas que é mediado por um recetor específico, o HCP1 (Heme receptor protein 1).^{10, 98} O mecanismo de absorção intestinal é controlado pela ação da hepcidina produzida pelo fígado, que atua no intestino bloqueando a ação da ferroportina e consequentemente diminuindo a entrada de ferro em circulação.⁹⁷ A ferroportina é o único exportador celular de ferro conhecido e é expresso constitutivamente por células endoteliais e



macrófagos.⁹⁹

Fig. 6 - Distribuição de ferro pelo organismo humano em adultos (adaptado de ⁹⁵)

Fisiologicamente a maior parte das células no organismo obtém o ferro a partir da Trf. Esta proteína liga os íons férricos livres na circulação, transporta-os e medeia a entrada nas células através do ciclo da Trf. O complexo Trf-ferro liga-se ao recetor da Trf 1 (TfR1 - Transferrin receptor 1) que se encontra na membrana celular e, este complexo sofre endocitose mediada pela clatrina. No citoplasma da célula, uma bomba de prótons promove a acidificação do meio (pH=5,5) levando à libertação do íon férrico, sendo este de seguida reduzido ao íon ferroso que por sua vez é libertado para o citoplasma pela DMT1. O ciclo termina quando a apo-Trf é reciclada para a corrente sanguínea (Fig. 7).¹⁰

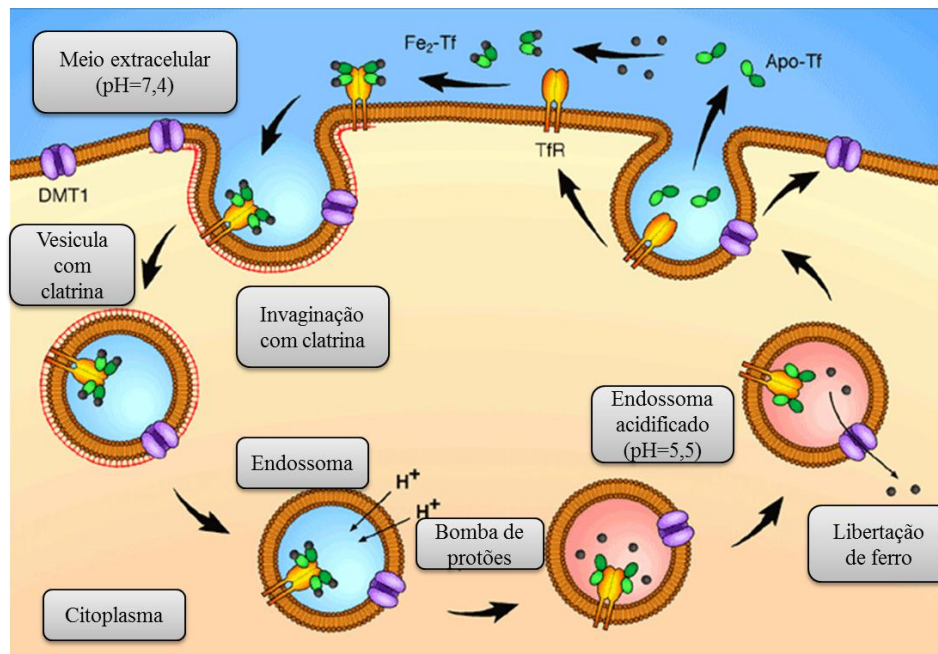


Fig. 7 – Ciclo da transferrina (adaptado de ¹⁰⁰)

5.2 O ferro e a diabetes

A evidência de que o metabolismo do ferro está relacionado com distúrbios no metabolismo da glicose provém da grande incidência de diabetes tipo 2 em pacientes com hemocromatose hereditária. No entanto, estudos posteriores verificaram que, independentemente da causa, o metabolismo da glicose se encontra alterado em indivíduos com sobrecarga de ferro.^{101, 102} McClain *et al.* verificaram a existência de elevados níveis de glicose em pacientes com hemacromatose hereditária, a deficiência na insulina e ainda, resistência à ação desta hormona.¹⁰³ Apesar de desconhecida a causa

da diabetes induzida pela sobrecarga de ferro, especula-se que se deva a três mecanismos; à deficiência na produção de insulina, ao aumento da resistência à ação da insulina e à disfunção hepática. A deficiência na insulina foi também verificada em estudos realizados em ratinhos, nos quais foi demonstrado que o excesso de ferro provoca a apoptose das ilhotas pancreáticas. Este efeito é devido ao aumento da expressão de DMT1, que promove uma maior acumulação de ferro e ao stress oxidativo mediado por este íão.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ A resistência à insulina pode ser causada pelo efeito direto do excesso de ferro na sua forma reativa, ou através de disfunção hepática.¹⁰⁷ A relação entre a alta absorção, os altos níveis de armazenamento do ferro e a diabetes tipo 2 é bem conhecida.¹⁰⁸ Isto foi demonstrado por vários estudos, onde se verificou que a ingestão de carne é um fator de risco para a diabetes tipo 2, devido à alta absorção do grupo heme presente na carne.¹⁰⁹⁻¹¹¹ Na diabetes tipo 2 os níveis de ferritina no soro encontram-se também aumentados.¹¹² A ferritina é uma proteína com capacidade de armazenar ferro e funciona como indicadora dos níveis de ferro no organismo.⁸ Finalmente, a melhoria verificada no controlo glicémico e resistência à insulina, com a redução dos níveis de ferro no organismo por terapia com agentes quelantes ou flebotomia, sugerem um papel patogénico do ferro na diabetes tipo 2.^{7, 113}

Determinadas patologias caracterizadas pela sobrecarga de ferro, como a hemocromatose e a talassemia levam ao aparecimento de ferro não ligado à Trf (NTBI – Non-transferrin bound iron).^{11, 12} O termo NTBI é geralmente utilizado para indicar não só ferro não ligado à transferrina mas também o ferro não ligado à ferritina ou ao grupo heme. O ferro livre tem elevada capacidade redox podendo gerar radicais livres que são conhecidos por causar danos em estruturas vitais.¹¹⁴ Nos casos onde ocorre sobrecarga de ferro o aparecimento de NTBI está associado à total saturação da transferrina.¹³ No entanto existem estudos que detetaram NTBI quando a transferrina não se encontrava totalmente saturada.^{14, 15} Apesar de Van Campenhout *et al.* não verificar aumento de NTBI nos pacientes com diabetes melito¹⁶, Sulieman *et al.*, Lee *et al.* e Leoncini *et al.*^{17, 18, 115} demonstraram aumentos significativos desta ocorrência, apesar de não ocorrer variação significativa da saturação da Trf. Esta discrepância pode estar associada às diferentes metodologias utilizadas pelos autores, já que não existe uma metodologia específica para verificar a ocorrência de NTBI. Esta ocorrência pode estar associada à glicação da transferrina, já que a afinidade da Trf glicada para o ferro se encontra diminuída.

5.3 Transferrina

A Trf é maioritariamente produzida nos hepatócitos e sob condições normais encontra-se hiposaturada (~30%), possui ainda uma alta capacidade para ligar ferro, prevenindo desta forma a acumulação de ferro não ligado à Trf (NTBI - non-transferin-bound-iron).^{10, 96} Esta proteína possui um tempo de meia via de aproximadamente 7 dias, e a sua concentração no plasma é constante (entre 2 a 3 g/l). No entanto, a sua concentração pode ser diminuída quando a síntese é diminuída e a sua degradação ou excreção aumentadas.^{116, 117}

A Trf é constituída por 679 aminoácidos, possui um peso molecular de aproximadamente 79 kDa, 19 ligações dissulfito e é protegida por duas cadeias laterais de hidratos de carbono (ligados no N terminal ao Asn 413 e Asn 611). Estruturalmente esta proteína é caracterizada pela presença de dois lóbulos homólogos denominados de lóbulo-N (336 aminoácidos e 8 pontes dissulfito) e lóbulo-C (343 aminoácidos e 11 pontes dissulfito), que podem ligar dois iões férricos de uma forma dependente do pH.^{96, 117-119} Cada lóbulo é constituído por dois subdomínios, N1 e N2 no lóbulo N e C1 e C2 no lóbulo C, que por sua vez interagem entre si formando um forte domínio de ligação hidrofílico para o ião metálico.^{117, 120} Os subdomínios N1 e C1 consistem duas secções descontínuas, enquanto o N2 e C2 compreendem uma única região polipeptídica contínua. Estes sofrem uma modificação conformacional para libertar ou capturar o ferro, como exemplo a Lys-206 e a Lys-296 formam uma ponte de hidrogénio entre si quando o ferro se encontra ligado, no entanto quando o pH baixa, a ponte de hidrogénio quebra-se, os subdomínios rodam e o ferro é libertado.^{39, 117} Em ambos os lóbulos existe um local de ligação ao ferro que possui quatro aminoácidos conservados, duas tirosinas, um ácido aspártico, e uma histidina (ex. Lóbulo-N – Asp 63, Tyr 95, Tyr 188 e His 249). A estabilização da ligação do ferro à Trf requer ainda a ligação de dois átomos de oxigénio, que geralmente provêm de um ião carbonato.¹¹⁷

No plasma humano é possível encontrar quatro isoformas da Trf de acordo com o número e local de ligação do ião férrico. Sendo assim 1) caso não haja iões férricos ligados a proteína estamos perante a isoforma Fe0-Trf ou apo-Trf 2) se um ião Fe^{3+} se encontra ligado ao lóbulo N-terminal a isoforma Fe1N-Trf, 3) se o ferro está ligado ao C-terminal a isoforma Fe1C-Trf e finalmente 4) se ambos os lóbulos estiverem ligados a Fe^{3+} a isoforma Fe2-Trf ou holo-Trf.¹²¹

5.4 Glicação da transferrina

A glicação da Trf pode ser um problema, porque induz modificações estruturais que podem provocar a perda de função da Trf. Ainda não foram feitos muitos estudos que elucidem as alterações na funcionalidade da Trf quando sujeita a glicação. Van Campenhout *et al.* verificaram num estudo *in vitro* que a glicação facilita a ligação inicial do Fe^{3+} à transferrina, contudo na presença de maiores concentrações deste ião a ligação torna-se mais fraca e o ferro mantém atividade redox. No mesmo estudo observou-se ainda que a distribuição das isoformas da Trf se encontrava alterada.¹²¹ Mais uma vez Van Campenhout *et al.*, num estudo para desenvolver uma nova técnica de quantificação da glicação da Trf *in vivo*, verificou que os níveis de glicação desta proteína se encontram aumentados na diabetes, e que a capacidade de ligação da Trf ao ferro se encontrava diminuída.¹²² Goodarzi *et al.*, ao estudar os efeitos da glicação da Trf na sua capacidade antioxidante, concluíram também que a sua capacidade de ligação ao ferro se encontrava diminuída.³⁹ Contudo, até hoje não existe uma caracterização estrutural dos produtos de glicação da Trf, não sendo desta forma possível compreender quais as alterações conformacionais responsáveis pela diminuição da afinidade desta proteína para o ferro. Como a Trf tem um tempo de vida curto, a sua glicação envolve principalmente a formação de PA, uma frutossamina, entre o grupo aldeído da glicose e os grupos amina livres das cadeias laterais dos aminoácidos da Trf.¹²² Para compreender o mecanismo que promove a diminuição da capacidade de ligação de ferro pela transferrina, é necessário identificar os resíduos suscetíveis de sofrer glicação e verificar a influência destes resíduos modificados na ligação ao ferro.

6. Materiais e Métodos

6.1 Reagentes

A transferrina do soro humano (pureza $\geq 98\%$, quantidade de ferro $\leq 0,005\%$), o NBT (Nitroblue tetrazolium; N5514), o NTA (ácido nitrilotriacético, N0128) e o DMF (1-Deoxy-1-morpholino-D-fructose; D6149) foram adquiridos à Sigma-Aldrich. O padrão de ferro (TraceCERT[®], 1000 mg/L Fe; 43149) à Fluka e a tripsina (TPCK treated, 4370285) foi adquirida à Applied Biosystems.

6.2 Glicação *in vitro* da Apo- e holo-transferrina humana

A apo-Trf humana foi dissolvida em tampão fosfato de sódio (20 mM) com azida (0,02%) a pH 7.4 contendo diferentes concentrações de D-Glucose (0, 10, 100, 500 mM) para uma concentração final 2,5g/l de proteína. As amostras foram incubadas durante 7 e 14 dias a 37 °C, após os quais foi removido o excesso de glucose por ciclos de concentração/diluição (6 ciclos de 15 minutos a 10000 g) com tampão fosfato de sódio (20 mM) com azida (0,02%) utilizando filtros Amicon Ultra-0,5 ml (MWCO 3kDa; Merck Millipore). As amostras foram então congeladas a -70 °C até posterior utilização.

A holo-transferrina foi preparada por dissolução de apo-transferrina humana em tampão Hepes (20 mM) com bicarbonato de sódio (25mM) para uma concentração final de 2.5 g/l. Adicionou-se Fe (77 mM): NTA(30 Mm) preparada no tampão anterior e a partir de um padrão de ferro. A percentagem de saturação foi seguida no espectrofotómetro (GENESYS 10 UV-Visible Spectrophotometer; Thermo Scientific) recorrendo ao rácio A_{278}/A_{465} . A concentração foi determinada recorrendo aos coeficientes de esticção molar (ξ). A apo-Trf possui um ξ_{278} de $93000 \text{ m}^{-1}\text{cm}^{-1}$ atribuído às transições $\pi\text{-}\pi^*$ dos aminoácidos aromáticos. Já a holo-Trf possui um ξ_{465} de $5000 \text{ m}^{-1}\text{cm}^{-1}$ que corresponde a transferência de carga das tirosinas para o ferro.¹²³

A glicação das amostras de holo-Trf foi posteriormente obtida por procedimento igual ao utilizado para a apo-Trf. Os ciclos de concentração/diluição foram feitos com tampão fosfato sódio (20mM) com bicarbonato de sódio (25mM) e azida (0,02%).

Em ambos os casos a concentração final de Trf foi determinada recorrendo ao kit comercial da Bio-Rad (DC protein assay) que se baseia no método de Lowry¹²⁴. A absorvância foi determinada num leitor de microplacas (Multiskan GO, Thermo

Scientific) a 750 nm, e a concentração foi obtida a partir de uma reta de calibração construída com concentrações conhecidas de Trf.

6.3 Quantificação dos níveis de glicação da apo- e holo- Trf humana

Os níveis de glicação da transferrina foram determinados a partir da concentração de frutose-amina, recorrendo ao método colorimétrico do NBT (Nitroblue tetrazolium) como descrito por Johnson *et al.*¹²⁵. O procedimento adotado para a medição da frutose-amina consistiu em adicionar a amostra (0,1 g/l) ao tampão bicarbonato de sódio (0,1 M e pH 10,8) contendo 0,25 mM NBT. Mediu-se a absorvância a 530 nm num leitor de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific) durante 30 min (com intervalos de 1 min) a 37 °C. Os valores entre os 5 e os 20 minutos foram comparados com uma reta de calibração conseguida a partir de DMF comercial.

6.4 Avaliação da capacidade de ligação ao ferro da apo-Trf humana

A avaliação da eficiência de ligação Fe^{3+} à Trf foi conseguida por adaptação do procedimento descrito por Van Campenhout *et al.*¹²¹. A apo-Tf (para uma concentração final de 2,5g/l) foi dissolvida em tampão fosfato de sódio (20 mM) com bicarbonato de sódio (25mM) (pH 7,4). Preparou-se uma solução de ferro e ácido nitrilotriacético (Fe:NTA) em tampão fosfato de sódio (20 mM) com bicarbonato de sódio (25 mM) com um rácio molar de 1 para 2 a partir do padrão de ferro. A solução Fe:NTA foi adicionada à amostra de forma a obter uma saturação teórica da transferrina de 100%, e a formação de complexos Fe-Trf foi monitorizada espectrofotometricamente a 450 nm durante 90 minutos (GENESYS 10 UV-Visible Spectrophotometer; Thermo Scientific).

6.5 Análise da Trf glicada não digerida por MALDI-TOF-MS

O número de modificações ocorridas na apo- e holo-Trf foi determinado recorrendo a MALDI-TOF-MS (4800 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems, Europe). Esta técnica tem por base o desvio de massa causado pela formação de adutos com a glucose. A partir do desvio de massa é possível aferir o número de adutos formados com a proteína, possibilitando assim quantificação do número de modificações esperadas nas diferentes condições de incubação. Para isso as amostras foram passadas por uma zip tip (ZipTip com 0,6 µL de resina C4, Merck Millipore) de acordo com as indicações do fabricante. De seguida misturaram-se volumes iguais de

amostra e matriz, aplicou-se numa placa de MALDI em quadruplicado e deixou-se cristalizar. A matriz utilizada foi o ácido α -4-ciano-hidroxicinâmico 5mg/ml (α -CHCA) preparada numa mistura de 1:1 água:acetonitrilo com 0,1% ácido trifluoroacético. Os espectros foram obtidos com o espectrómetro MALDI-TOF-MS em modo positivo (com uma gama de massa 20000-90000 com aproximadamente 1500 tiros laser).

6.6 Identificação das modificações da apo- e holo-Trf humana glicada por espectrometria de massa tandem

Digestão com tripsina

As amostras de apo- e holo- Trf glicadas foram diluídas em tampão fosfato de sódio (20 mM) e tampão fosfato de sódio (20 mM) com bicarbonato de amónia 25 (mM), respetivamente para uma concentração de 0,1 g/l. A digestão triptica ocorreu durante a noite a 37 °C com um rácio molar de 1 de tripsina: 20 Transferrina.

Separação e Análise dos digestos por nano-HPLC-ESI- Ion Trap-MS/MS

A análise dos digestos foi conseguida recorrendo à técnica separativa nano-cromatografia líquida de fase reversa acoplada a uma trapa iónica linear¹²⁶ com fonte de ionização de nano-electrospray (nano-HPLC-ESI-Ion Trap-MS/MS). A separação por nano-HPLC foi efetuada num instrumento *Ultimate 3000 (UltiMate 3000 RSLCnano System; Thermo scientific)*. Foram injetados 2µg de cada amostra numa coluna C18 (*Dionex C18 Acclaim 120*, partículas de 5µm; *Thermo scientific*), sendo posteriormente lavadas isocronicamente com 95% de tampão A (5% acetonitrilo, 0,1% ácido fórmico) durante 3 minutos e com 5% de tampão B (90% acetonitrilo, 0,1% ácido fórmico) com um caudal de 30 µl/min. Após 3 minutos o fluxo foi redirecionado para a coluna analítica capilar (*Dionex C18 Pepmap 100*, partículas de 3µm, 150 mm x 75 µm; *Thermo scientific*) com um caudal de 0,3 µl/min. A separação dos péptidos ocorreu utilizando um gradiente linear de 5-50% de tampão B durante 57 min, 50-90% tampão B durante 2 min e por fim 3 minutos com 90% tampão B. O espectrómetro (*Linear ion trap LXQ; Thermo Scientific*) foi ajustado para modo positivo e os péptidos foram ionizados aplicando uma voltagem de 1,9 kV à agulha e uma temperatura do capilar de transferência de 275°C. Foram obtidos espectros até MS³. Para a aquisição *data dependent* dos espectros de MS/MS, foi utilizado um intervalo de seleção de 0,5 Da com tempo de ativação de 30ms. A energia de colisão normalizada foi de 35%.

Análise bioinformática

A análise bioinformática dos espectros de massa foi conseguida utilizando o algoritmo turbosequest, (Sequest-Bioworks 3.1; Thermo Scientific) e uma base de dados interna da Trf. Foram feitas pesquisas referentes às modificações por formação de adutos quer com a lisina quer com a arginina (Tabela 1). Os parâmetros de pesquisa compreenderam duas clivagens falhadas, um máximo de três modificações por péptido, com uma tolerância de 1 amu para o íon precursor e de 2 amu para os íons fragmento. Todas as identificações de péptidos contendo modificações foram confirmadas manualmente. No anexo 1 encontram-se sumariados os resultados das pesquisas bioinformáticas e no anexo 2 os espectros de MS tandem dos péptidos modificados por glicação.

Tabela 1 – Desvios de massa associados a adutos de glicação envolvendo a lisina

Adutos de glicação envolvendo a lisina	Desvio de massa (Da)
Frutose-lisina	162,05
Frutose-lisina-H ₂ O	144,04
Frutose-lisina-2H ₂ O	126,03
N-Carboxi-etil-lisina	72,02
N-Carboxi-metil-lisina	58,01
Pirralina	108,02

Adutos de glicação envolvendo a arginina	
N-[5-(2,3,4-trihidroxibutil)-5-hidro-4-imidazolona-2-il]ornitina	144,04
Tetrahidropirimidina	144,04
Imidazolona B	142,03
Argpirimidina	80,03
N-(5-Hidro-5-metil-4-imidazolona-2-il)ornitina	54,01
N-(5-Hidro-4-imidazolona-2-il)ornitina	39,99

6.7 Análise estatística

Os resultados são apresentados como médias de triplicados com o desvio padrão associado. O significado estatístico das diferenças entre amostras foi avaliado com base no algoritmo *1 way ANOVA* com o pós-teste *Tukey*.

7. Resultados

A determinação do efeito da glicação não enzimática e a determinação dos resíduos de aminoácidos modificados foi realizado *in vitro* em apo- e holo-Trf com dois períodos de incubação (7 e 14 dias), e com diferentes concentrações de D-Glucose (0, 10, 100, 500 mM). Após incubação nas diferentes condições aferiram-se os níveis de glicação e o efeito desta na capacidade da ligação de ferro pela Trf recorrendo a métodos colorimétricos. Por fim identificaram-se os locais de glicação da apo-Trf glicada, obtida com as diferentes concentrações de D-Glucose, por análise dos digestos tripticos das diferentes amostras recorrendo à utilização de nano-HPLC-ESI-ionTrap-MS/MS

7.1 Determinação dos níveis de glicação *in vitro* da apo- e holo-Trf humana

Neste estudo utilizou-se o método de deteção da frutose-lisina baseado num ensaio colorimétrico com NBT (nitroblue tetrazolium) de forma a averiguar a extensão da glicação. Os níveis de glicação para as diferentes incubações encontram-se representados na Fig. 8, onde se encontra representado o número de modificações esperado para as diferentes condições de incubação, sob a forma de μmol de frutose-lisina por μmol de Trf. Verificou-se a tendência de um aumento dos níveis de frutose-lisina para a apo e holo-Trf, quer com o aumento do tempo de incubação quer com o aumento da concentração de glucose utilizado. Para as amostras com apo-Trf incubadas por 7 dias (Fig. 8 a)) verificou-se variação estatisticamente significativa para as amostras incubadas com 100 ($P<0,01$) e 500 mM ($P<0,001$) de D-glucose quando comparadas com o controlo (incubação sem D-Glucose). Nestas amostras verificou-se um aumento de 1,88 (100 mM) e 2,43 (500 mM) mol de frutose-lisina por mol de Trf em relação ao controlo. Nas amostras incubadas por 14 dias as incubações com 100 e 500 mM D-glucose apresentam também diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo ($P<0,001$ e $P<0,01$ respetivamente). No entanto com 500 mM de D-glucose a variação foi muito maior com uma diferença de 16,55 mol de frutose-lisina por mol de Trf em relação ao controlo. A incubação de holo-Trf (Fig. 8 b)) apresentou um comportamento semelhante, no entanto, para ambos os tempos de incubação, apenas a amostra incubada com 500 mM de glucose apresentou uma variação estatisticamente significativa quando comparada com o controlo ($P<0,001$). Da mesma forma que as amostras de apo-Trf a incubação com 500 mM de glucose na incubação por 14 dias

apresenta uma variação mais significativa (11,6 mol de frutoselisina por mol de Trf em relação ao controlo) que a amostra incubada por apenas 7 dias (2,3 mol de frutoselisina por mol de Trf em relação ao controlo). Os níveis de glicação da apo-Trf apresentavam-se mais elevados quando comparados com a holo-Trf sendo a diferença mais significativa para as amostras incubadas por 14 dias. Contudo os resultados foram apenas estatisticamente significativos quando foram comparadas as amostras incubadas com 100 e 500 mM de glucose ($P<0,01$) por 7 dias, e as incubadas com 500 mM ($P<0,001$) por 14 dias.

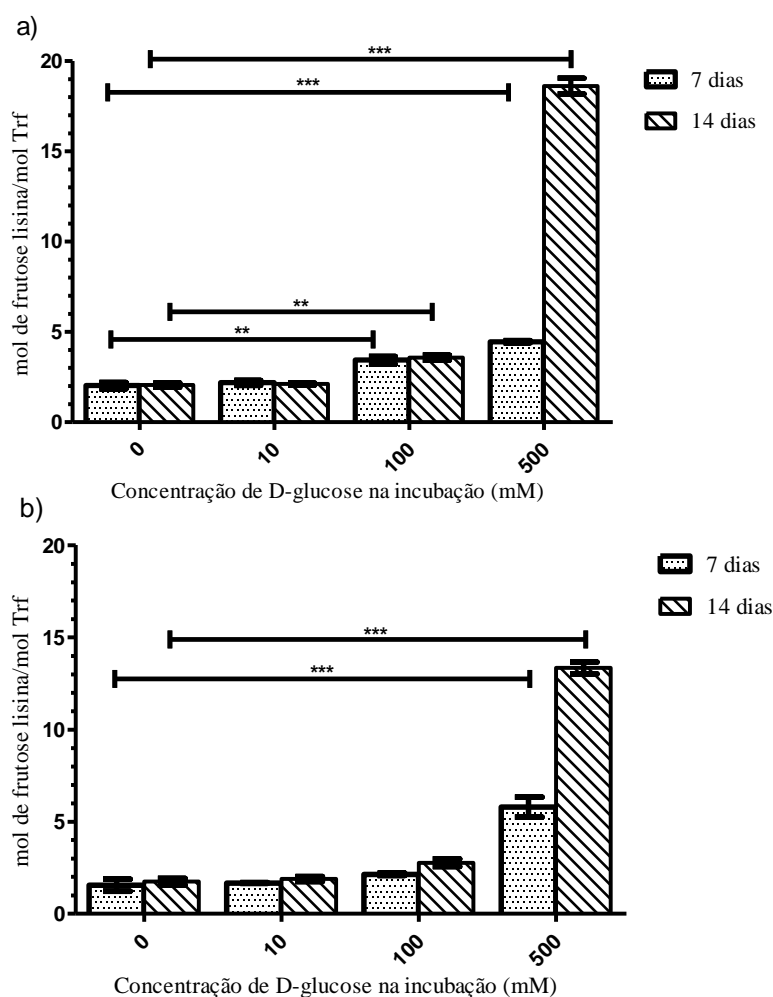


Fig. 8 – Concentração de frutose-lisina normalizada à quantidade de proteína na amostra (mol de frutose-lisina por mol de Trf) determinada por ensaio colorimétrico com NBT após incubação com 0, 10, 100, 500 mM de D-glucose durante 7 e 14 dias da a) apo-Trf e b) holo-Trf. * - $P<0,05$; ** - $P<0,01$, *** - $P<0,001$

7.2 Análise da apo- e holo Trf glicada não digerida por espectrometria de massa

A análise das proteínas não digeridas foi executada recorrendo a MALDI-TOF-MS com o intuito de se quantificar os produtos iniciais de glicação formados em cada uma das condições de incubação com D-glucose. Este método tem por base o desvio de massa de 162,04 Da causado pela formação do aduto glucose-Trf, por sítio de ligação. A Fig. 9 apresenta um exemplo dos espectros obtidos por MALDI-TOF-MS para o controlo (0 mM de D-glucose) e para a amostra pré incubada por 14 dias com 500 mM de D-glucose. Pela análise dos espectros identificou-se os picos referentes ao ião molecular ($[\text{Trf}+\text{H}]^+$) e ainda picos referentes ao ião molecular com cargas múltiplas ($[\text{Trf}+2\text{H}]^{2+}$, $[\text{Trf}+3\text{H}]^{3+}$). As massas médias para cada um dos picos obtidos para as diferentes condições de incubação encontram-se representadas na tabela 2. Após obtidos os espectros de massa calculou-se o número de modificações com base na diferença de massa de acordo com a equação 2:

$$n = \frac{m_A - m_C}{m_G} \quad (\text{Equação 2})$$

onde, n corresponde ao número de modificações esperadas, m_A à massa obtida da amostra glicada, m_C à massa obtida para o controlo e por fim m_G a massa de D-Glucose.

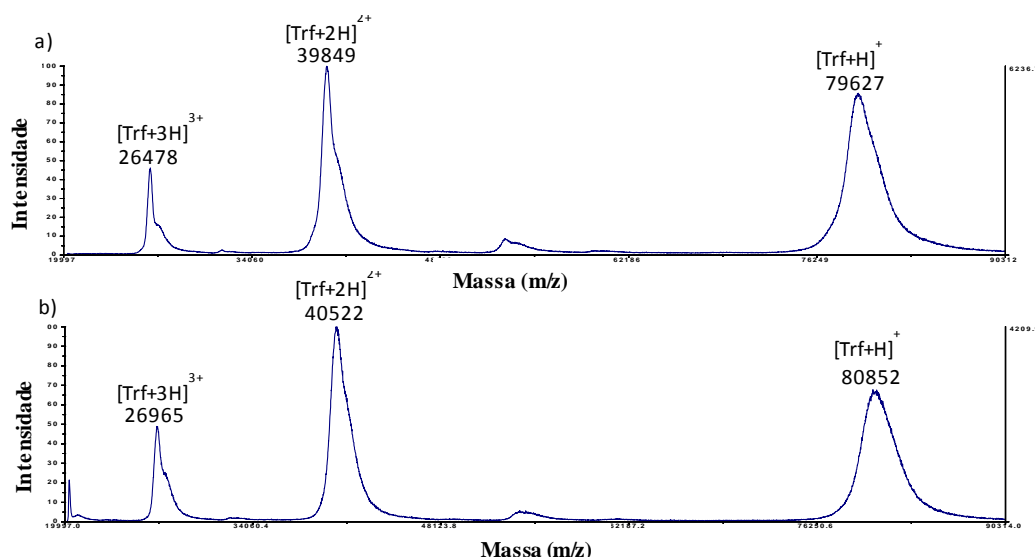


Fig. 9 - Espectros exemplificativos dos espectros obtidos por MALDI-TOF-M com as massas médias dos quadruplicados para a amostra incubada por 14 dias a) sem D-glucose e b) com 500mM de D-glucose

O número de modificações por molécula de holo- e apo-Trf, calculados de acordo com a equação 1 para os diferentes tempos de incubação (7 e 14 dias) e para as

diferentes condições de incubação com D-Glucose encontram-se apresentados na tabela 2. Pela tabela verifica-se que quer o aumento da concentração de D-glucose na incubação quer o aumento do tempo de incubação levam ao aumento do número de modificações. Para a apo-Trf incubada por 7 dias foram calculadas a presença de 7 modificações para a incubação com 500 mM de D-glucose e 3 para a incubação com 100 mM de D-glucose. Já para a incubação por 14 dias foram obtidas 4 modificações para as amostras incubadas com 100 mM D-glucose e 9 para as incubadas com 500 mM D-glucose.

Tabela 2 - Número de modificações observado para a apo- e holo-Trf incubadas durante 7 e 14 dias com 0, 10, 100, 500 mM de D-glucose determinadas por MALDI-TOF-MS

	Tempo de incubação (dias)	Concentração de D-glucose (mM)	Massa (Da) \pm Desvio padrão			Número de modificações calculadas
			[Trf+H] ⁺	[Trf+2H] ²⁺	[Trf+3H] ³⁺	
Apo-Trf	7	0	79858 \pm 71	39854 \pm 32	26465 \pm 27	0
		10	79780 \pm 161	39813 \pm 28	26459 \pm 6	
		100	80222 \pm 92	40096 \pm 46	26629 \pm 25	
		500	80793 \pm 49	40445 \pm 51	26830 \pm 33	
	14	0	79626 \pm 43	39848 \pm 56	26478 \pm 22	0
		10	79932 \pm 49	39820 \pm 57	26481 \pm 12	
		100	80323 \pm 160	40148 \pm 81	26665 \pm 25	
		500	80852 \pm 37	40522 \pm 18	26965 \pm 18	
Holo-Trf	7	0	80293 \pm 32	39805 \pm 29	26541 \pm 4	2
		100	80233 \pm 94	4009 \pm 75	26592 \pm 25	
		500	81007 \pm 172	40584 \pm 106	26877 \pm 41	
	14	0	80056 \pm 305	39885 \pm 89	26505 \pm 22	3
		100	80340 \pm 115	40265 \pm 81	26716 \pm 77	
		500	81476 \pm 120	40833 \pm 71	27160 \pm 28	

7.3 Identificação das modificações induzidas por glicação na apo- e holo-Trf por espectrometria de massa tandem

A identificação das modificações foi conseguida por HPLC-ESI-Ion Trap-MS/MS e posterior análise bioinformática (Sequest-Bioworks; Thermo Scientific). Teve-se por objetivo identificar os aminoácidos modificados e quais os produtos de glicação formados. No decorrer das pesquisas para a identificação dos péptidos modificados obteve-se uma taxa de cobertura entre 85 e 91% para a apo-Trf e entre 69 e 81% para a holo-Trf. As modificações encontradas com base nestas pesquisas encontram-se apresentadas na tabela 3 para a apo-Trf com 7 e 14 dias de incubação com glucose. Não foi possível encontrar produtos iniciais de glicação com argininas. Os espectros obtidos por MS/MS referentes às amostras da holo-Trf apresentavam uma

baixa cobertura do péptido, o que impossibilitou a identificação fiável das modificações induzidas pela glicação.

Para a apo-Trf e, de encontro aos resultados anteriormente obtidos, verificou-se um número crescente de modificações com o aumento das concentrações de D-glucose. No controlo e na amostra incubada com 10 mM de D-glucose identificaram-se apenas duas lisinas modificadas (K278 e K260) no péptido 277-291, independentemente do tempo de incubação. Para a amostra incubada com 100 mM de glucose por 7 dias observou-se a modificação de quatro lisinas (K196, K206, K278 e K260) nos péptidos. Já para a amostra incubada com as mesmas condições de glucose mas por 14 dias foram identificadas cinco lisinas modificadas (K103, K260, K278, K496, K534). As incubações com 500 mM de glucose, como observado anteriormente, foram as que apresentaram um maior número de lisinas modificadas. Para a incubação por 7 dias identificaram-se dez lisinas modificadas (K196, K206, K276, K278, K260, K291, K296, K312, K447 e K534). Já para as amostras incubadas por 14 dias o número de modificações foi ainda superior, detetando-se doze lisinas modificadas (K103, K206, K260, K276, K278, K280, K296, K312, K447, K534, K649 e K657).

No decorrer das pesquisas obtiveram-se alguns espectros de menor qualidade onde o péptido não se encontrava totalmente identificado. As modificações representadas com um “*” na tabela 3 correspondem a modificações identificadas pela massa do péptido. Apesar de uma boa cobertura da sequência do péptido no espectro de MS/MS, a lisina onde se encontrava a modificação não era identificada, no entanto pelo desvio na massa do ião precursor pode concluir-se que a modificação esta presente. No péptido 277-291 apesar da grande maioria dos aminoácidos se encontrarem identificados, os iões fragmento, quer da série yn ou bn, não cobrem a posição da lisinas 278 ou 280. A probabilidade calculada pelo *software* indicava por vezes a ocorrência da modificação apresentada, e por vezes para a modificação correspondente ao aduto carboxi-etil-lisina na posição 278 (K278) e frutoselisina na posição 280 (K280). Já que as duas modificações foram identificadas no mesmo péptido, não foi possível determinar qual a modificação que ocorre em cada lisina.

O aduto primário da reação de glicação consiste em frutose-lisina, que promove um desvio de massa de 162,05 Da. A baixa incidência deste aduto no decorrer da análise bioinformática deveu-se a perdas neutras que são comuns na análise de proteínas glicadas por MS. O *software* identificou uma perda neutra de 56,03 Da em vários péptidos. Procedeu-se ainda à confirmação manual desta ocorrência (recorrendo ao

Tabela 3 - Modificações encontradas após análise dos peptídeos tripticos obtidos a partir das amostras de transferrina incubadas com glucose (0, 10, 100, 500) durante 7 e 14 dias por HPLC-ESI-Ion Trap-MS/MS; onde PIR corresponde a uma modificação por adição de uma pirralina; CEL -carboxi-etil-lisina; FL-H₂O- Frutoselisinacom uma desidratação, FL-2H₂O- Frutoselisina e por fim FL-frutoselisina com uma desidratação. As modificações que se encontram marcadas com * correspondem a modificações identificadas de forma indireta.

Apo-Trf com 7 Dias de incubação			
Concentração Glucose (mM)	Resíduo aminoácido	Sequência peptídica	Aminoácido/modificação
0	277-291	DK'SK'EFQLFSSPHGK	K278*/K280*(FL/CEL)
10	277-291	DK'SK'EFQLFSSPHGK	K278*/K280*(FL/CEL)
100	194-206	CLK'DGAGDVAFVK	K196 (FL-H ₂ O)
	197-217	DGAGDVAFVK'HSTIFENLANK	K206 (FL)
	277-291	DK'SK'EFQLFSSPHGK	K278*/K280*(FL/CEL)
500	194-206	CLK'DGAGDVAFVK	K196 (FL-H ₂ O)
	197-217	DGAGDVAFVK'HSTIFENLANK	K206 (FL)
	260-278	EDLIWELLNQAQEHFGK'DK	K276 (FL)
	277-291	DK'SK'EFQLFSSPHGK	K278*/K280*(FL/CEL)
	281-296	EFQLFSSPHGK'DLLFK	K291 (FL)
	292-304	DLLFK'DSAHGFLK	K296 (FL)
	309-324	MDAK'MYLGYYVTAIR	K312 (FL)
	435-447	SASDLTWDNLK'GK	K445 (FL)
	528-545	GDVAFVK'HQTPQNTGGK	K534 (FL)
Apo-Trf com 14 Dias de incubação			
Concentração Glucose (mM)	Resíduo aminoácido	Sequência peptídica	Aminoácido/modificação
0	277-291	DK'SK'EFQLFSSPHGK	K278*/K280*(FL/CEL)
10	277-291	DK'SK'EFQLFSSPHGK	K278*/K280*(FL/CEL)
100	103-113	K'DSGFQMNQLR	K103 (FL-2H ₂ O)
	277-291	DK'SK'EFQLFSSPHGK	K278*/K280*(FL/CEL)
	491-511	DSSLCK'LCMGSGNLNCEPNK	K496 (FL)
	528-545	GDVAFVK'HQTPQNTGGK	K534 (FL)
500	103-113	K'DSGFQMNQLR	K103 (FL)
	197-217	DGAGDVAFVK'HSTIFENLANK	K206 (FL)
	260-278	EDLIWELLNQAQEHFGK'DK	K276 (FL)
	277-291	DK'SK'EFQLFSSPHGK	K278*/K280*(FL/CEL)
	292-304	DLLFK'DSAHGFLK	K296 (FL)
	292-304	MDAK'MYLGYYVTAIR	K312(FL)
	435-447	KSASDLTWDNLK'GK	K445 (FL)
	528-545	GDVAFVK'HQTPQNTGGK	K534 (FL))
	645-657	NTYEK'YLGEEYVK	K649 (FL)
	649-663	YLGEEYVK'AVGNLR	K657 (FL)

- A modificação encontrada no peptído 296-310 foi ainda encontrada na sua forma inversa, ou seja a k297 modificada com a carboxi-etil-lisina e a k299 com a frutose-lisina.

- As modificações representadas com um “*” foram determinadas com base na massa do peptído

software Qual browser; Excalibur). Em todos os casos, com base na massa do íão precursor, verificou-se que se tratava do aduto frutose-lisina que sofria três desidratações aquando da obtenção do MS². A identificação quer do péptido, quer da modificação, ocorre pelo padrão de fragmentação do MS³ obtido a partir da fragmentação do íão referente ao pico mais intenso do MS², sendo assim, a modificação devolvida pelo *software* correspondia a um desvio de massa 108,02 Da.

As modificações verificadas na apo-Trf (pré incubada com 0, 10, 100, 500 mM de D-glucose por 7 e 14 dias) foram representadas na estrutura primária da proteína (Fig. 10), onde se verificou uma maior incidência de lisinas modificadas no lóbulo N nas amostras de apo-Trf incubadas por 7 dias. Já na amostra incubada por 14 dias a distribuição foi mais uniforme. Na figura 10, foram ainda representados os aminoácidos que desempenham uma função relevante na ligação do ferro à Trf, os resíduos diretamente envolvidos na coordenação ao ferro (Asp63, Tyr95, Tyr188, His249, Asp392, Tyr426, Tyr 517 e His 585), os aminoácidos que estabilizam a ligação do ferro por formação de pontes de hidrogénio (Lys206, Lys296, Lys534, Arg632, Asp634), os locais de ligação do íão carbonato e por fim os resíduos que permitem a alteração conformacional ocorrida aquando da ligação do ferro (Thr93, Val246, Pro247, Ala 424, Gly425, Arg581, Ala 582, Pro583). Verificou-se a presença de três lisinas modificadas (K206, K296, K534) que participam na estabilização da ligação do íão férrico. Apesar das restantes modificações não parecerem estar diretamente relacionadas com a capacidade da Trf, enquanto quelante de ferro, optou-se por apresentar a localização das modificações na representação tridimensional da holo-Trf (publicada por Wally *et al.*¹²⁷ PDB ID 2HAU) após incubação com D-glucose (0, 10, 100, 500 mM) (Fig. 11).

De forma análoga à sequência primária representaram-se na estrutura tridimensional os aminoácidos relevantes na ligação do ferro à transferrina. A estrutura tridimensional demonstra de forma clara a presença dos dois lóbulos C (aminoácidos 1-331) e N (aminoácidos 339-679). As cavidades dos sítios de ligação ao ferro são também claramente distinguidas. Verifica-se ainda na base destes sulcos a presença dos sítios conservados de ligação ao ferro e os aminoácidos por onde ocorre a torção dos subdomínios aquando da ligação de ferro. Identificou-se ainda os domínios de ligação ao recetor da Trf (RTrf). Após representação dos aminoácidos passíveis de glicação da apo-Trf incubada com 0, 10, 100 e 500 mM D-glucose por 7 e 14 dias na estrutura tridimensional verificou-se que as modificações se encontravam maioritariamente à

superfície da proteína com exceção das lisinas 206, 296 e 534 que se encontram dentro das cavidades onde ocorre ligação ao ferro.

	1	11	21	31	41
MRLAVGALLV	CAVLGLCLAV	PDKTVRWCAV	SEHEATKCQS	FRDHMKSVIP	SDGPSVACVK
51	61	71	81	91	101
KASYLDCIRA	IAANEADAVT	LDAGLVYDAY	LAPNNLKPVV	AEFYGSKEDP	QTFY YAVAVV
111	121	131	141	151	161
KKDSGFQMNQ	LRGKKSCHTG	LGRSAGWNIP	IGLLYCDLPE	PRKPLEKAVA	NFFSGSCAPC
171	181	191	201	211	221
ADGTDFFPQLC	QLCPGCGCST	LNQYFGYSGA	FKCLKDGAGD	VAFVKHSTIF	ENLANKADRD
231	241	251	261	271	281
QYELLCLDNT	RKPVDEYKDC	HLAQVPSHTV	VARSMGGKED	LIWELLNQAQ	EHFGKDKSKE
291	301	311	321	331	linker 341
FQLFSSPHGK	DLLFKDSAHG	FLKVPPRMDA	KMYLGYEYVT	AIRNLREGTC	PEAPTDECKP
351	361	371	381	391	401
VKWCALSHHE	RLKCDEWSVN	SVGKIECVSA	ETTEDCIAKI	MNGEADAMSL	DGGFVYIAGK
411	421	431	441	451	461
CGLVPVLAEN	YNKSDNCEDT	PEAGYFAIAV	VKKSASDLTW	DNLKGKKSCH	TAVGRTAGWN
471	481	491	501	511	521
IPMGLLYNKI	NHCRFDEFFS	EGCAPGSKKD	SSLCKLCMGS	GLNLCEPNNK	EGYYGYTGAF
531	541	551	561	571	581
RCLVEKGDVA	FVKHQTV PQN	TGGKNPDPWA	KNLNEKDYEL	LCLDGTRKPV	EEYANCHLAR
591	600	611	621	631	641
APNHAVVTRK	DKEACVHKIL	RQQQHLFGSN	VTDCSGNFCL	FRSETKDLLF	RDDTVCLAKL
651	661	671			
HDRNTYEKYL	GEEYVKAVGN	LRKCSTSSLL	EACTFRRP		

Fig. 10 - Estrutura primária da Trf incluindo o péptido sinal (a vermelho) onde estão representadas, a sombreado amarelo, as modificações identificadas após incubação com glucose por 7 dias, com sombreado azul as identificadas após 14 dias e a verde as que foram verificadas em ambos. Com caixas a vermelho estão representados os sítios conservados de ligação ao ferro e a roxo os aminoácidos que estabilizam a ligação do ferro à Trf. Com realce rosa, estão representadas os locais por onde ocorre a alteração conformacional, com realce cinzento os sítios de ligação do ião carbonato e a sublinhado os sítios de interação com o recetor. O subdomínio N1 compreende os resíduos 1-92 e 247-331, o N2 os resíduos 93-246, o C1 os resíduos 339-425 e por fim o C2 os resíduos 426-572. (sequência adaptada de uniprotKB ID: P02787)



Fig. 11 - Representação em *cartoon* da Trf, onde se encontra representado os lóbulos C e N sob a forma dos seus subdomínios. O subdomínio C1 encontra-se a azul, o C2 a verde, o N1 a castanho e por fim o N2 a roxo. A vermelho estão representados os sítios de ligação do ferro a cinzento os sítios de ligação do ião bicarbonato a rosa os locais por onde ocorre a alteração conformacional, a laranja os aminoácidos que participam na estabilidade da ligação Trf-Fe, a preto o “linker” que liga os dois lóbulos, a azul os locais de interação com o RTrf e por fim a amarelo os resíduos amino acídicos modificados por glicação observados após pré incubação com d-Glucose. (adaptado de ¹²⁷ PDB ID 2HAU editada no Protein Workop RCBS PDB¹²⁸)

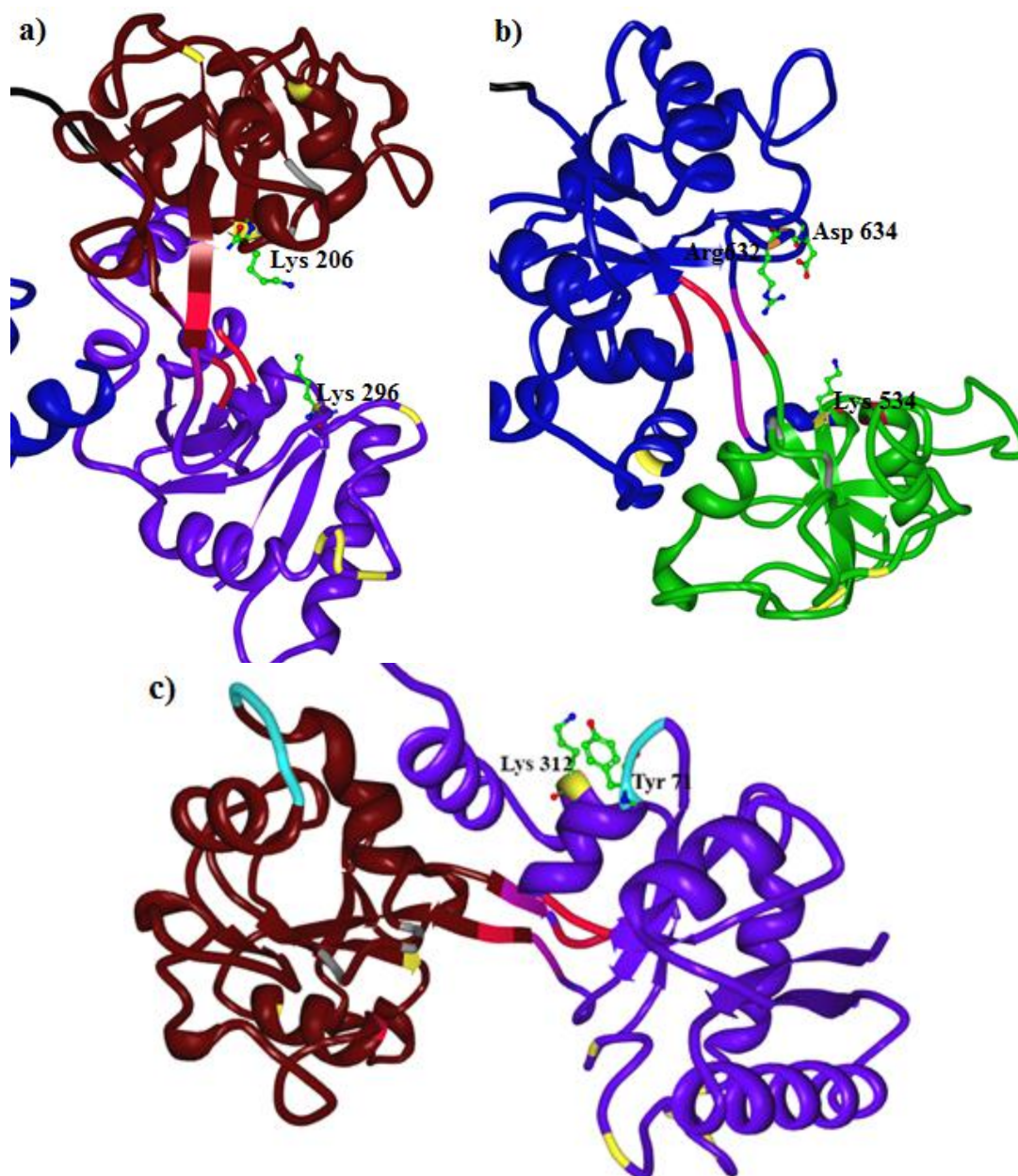


Fig. 12 - Representação em *cartoon* da Trf com ampliação das cavidades onde se liga o ferro. As lisinas modificadas após incubação com D-glucose (0, 10, 100, 500 mM) encontram-se representadas a amarelo, o subdomínio C1 encontra-se a azul, o C2 a verde, o N1 a castanho, o N2 a roxo. A vermelho estão representados os sítios de ligação do ferro a cinzento os sítios de ligação do ião carbonato, a rosa as dobradiças moleculares, a azul os sítios de ligação ao RTfr e a laranja os aminoácidos que participam na estabilidade da ligação Trf-Fe (adaptado de ¹²⁷ PDB ID 2HAU editada no Protein Worksop; RCSB PDB ¹²⁸).

7.4 Avaliação da capacidade de ligação ao ferro da apo-Trf glicada

A eficiência da ligação do Fe^{3+} foi avaliada seguindo espectrofotometricamente (a 465 nm) a formação de holo-Trf durante 90 minutos após adição de Fe:NTA até uma saturação teórica de 100%. Os dados recolhidos foram representados graficamente, sob a forma de absorvância em função do tempo (em min), onde o aumento da absorvância resulta do aumento da concentração de Trf ligada ao ferro (Fig. 13). A concentração inicial de apo-Trf é a mesma em todas as condições, sendo desta forma notório que com o aumento da glicação, a capacidade quelante da Trf diminui quer para as amostras incubadas com glucose por 7 dias (Fig. 13 a)) quer para as amostras incubadas por 14 dias (Fig. 13 b)).

Para elucidar os resultados, dado a pequena variação na absorvância entre as diferentes condições e ainda à sobreposição de alguns desvios padrão, optou-se por fazer análise estatística comparativa. As curvas foram obtidas com intervalos de 10 segundos durante 90 minutos. Sendo assim dado o elevado número de dados adquiridos, a comparação estatística entre as várias curvas foi executada apenas nos pontos referentes aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos. Para as amostras incubadas com glucose por 7 dias (Fig. 13 a)) as diferenças possuem significado estatístico ($P < 0,001$) com exceção da amostra correspondentes à incubação com 10 mM de D-glucose. Esta quando comparada com a amostra incubada sem D-glucose é apenas estatisticamente significativa com $P < 0,05$. A comparação das diferentes condições para as amostras após 14 dias de incubação (Fig. 13 b)) demonstrou que as diferenças entre amostras eram também estatisticamente significativas com $P < 0,001$.

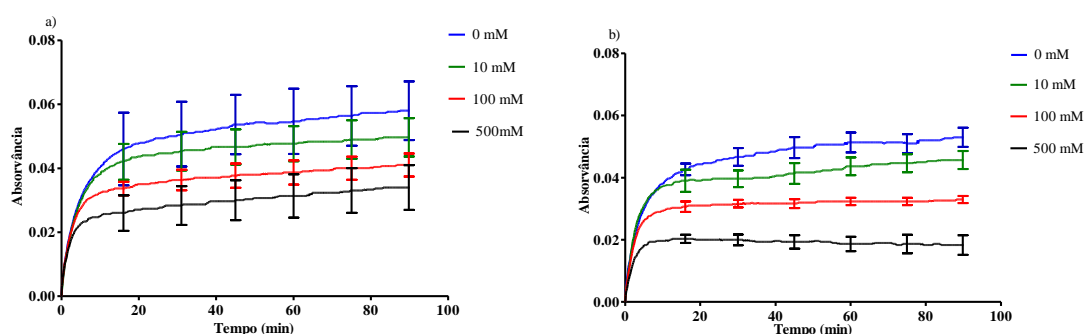


Fig. 13 – Comparação da capacidade quelante de ferro da Trf durante 90 min a 465 nm, após incubação com 0 (azul), 10 (verde), 100 (vermelho) e 500 (preto) mM de glucose durante a) 7 dias e b) 14 dias. A estatística comparativa para as diferentes condições de incubação apresentou significado estatístico com $P < 0,05$

Após 90 minutos de incubação com Fe:NTA a saturação máxima (Fig. 14) diminui com o aumento dos níveis de glicação em ambos os tempos de incubação (7 e 14 dias). Esta verificação foi apenas estatisticamente significativa para as amostras incubadas com 500 mM ($P<0,01$) de D-glucose por 7 dias e com 100 ($P<0,05$) e 500 ($P<0,001$) mM de D-glucose por 14 dias, quando comparadas com os respectivos controlos. Os controlos apresentam máximos de saturação de 73,4% e 67,0% para as incubações por 7 e 14 dias respetivamente. As amostras pré incubadas com 500 mM de glucose apresentam uma saturação máxima de 43,03% para a amostra incubada por 7 dias e 27,84% para a amostra incubada por 14 dias, ou seja, aproximadamente metade dos controlos.

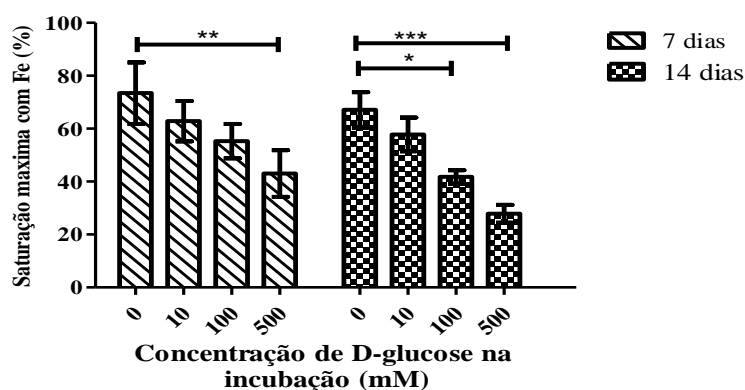


Fig. 14 - Comparação da saturação máxima em percentagem após 90 minutos de incubação com Fe:NTA da apo-Trf incubada com 0, 10, 100, 500 mM de D-glucose durante 7 e 14 dias. * - $P<0,05$; ** - $P<0,01$, *** - $P<0,001$

A velocidade inicial de formação do complexo Fe-Trf foi avaliada por aplicação de uma regressão linear entre os 20 e os 100 segundos (Fig. 15). Quando comparadas as diferentes condições de incubação com D-glucose para os dois tempos de incubação (7 e 14 dias) verificou-se em todos os casos uma ligeira variação sem significado estatístico. Contudo, e apesar de apenas a amostra referente à incubação com 500 mM

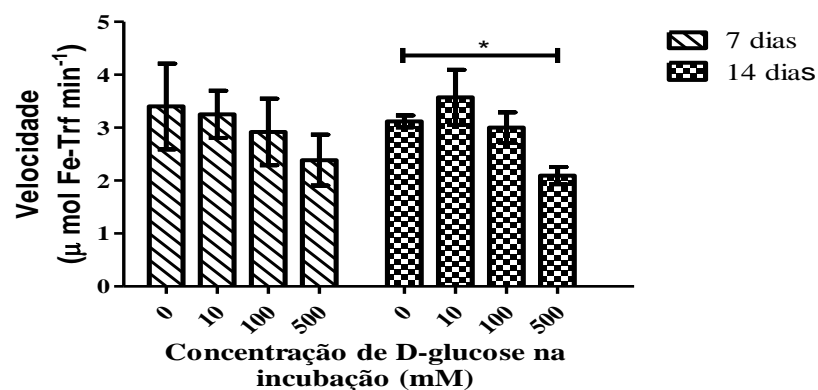


Fig. 15 – Comparação da velocidade inicial da ligação de ferro à Trf da apo-Trf incubada com 0, 10, 100, 500 mM de glucose durante 7 e 14 dias. * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$, *** - $P < 0,001$

de D-glucose por 14 dias apresentar significado estatístico ($P < 0,05$) quando comparada com o controlo, é notória a tendência para o decréscimo da velocidade inicial com o aumento dos níveis de glicação com exceção da amostra referente à incubação com 10 mM de D-glucose.

8. Discussão

No presente estudo *in vitro* verificou-se a possibilidade de induzir glicação da apo- e holo-Trf humana, por tratamento com diferentes concentrações de glucose durante dois períodos de incubação (7 e 14 dias). As diferenças nos níveis de glicação foram apenas significativas para as amostras incubadas com 100 e 500 mM de D-glucose, indicando assim, uma baixa suscetibilidade de glicação da Trf. A análise por espectrometria de massa da apo-Trf incubada com 0, 10, 100, e 500 mM de D-glucose permitiu a identificação de um máximo de 13 lisinas passíveis de sofrer glicação após 14 dias de incubação. As lisinas 206, 296 e 534 apresentavam-se modificadas por formação do aduto frutose-lisina, o que pode justificar a diminuição da capacidade de ligação ao ferro apresentada pela Trf glicada.

A determinação da extensão da glicação teve por base a determinação do número de adutos de frutose-lisina formados, e foi obtida espectrofotometricamente e por MALDI-TOF-MS. A determinação do número de modificações para as incubações de apo- e holo-Trf por 7 e 14 dias com 0, 10, 100, 500 mM de D-glucose por MALDI-TOF-MS apresentou a mesma tendência que a obtida pelo método colorimétrico, ou seja, aumento da glicação com o aumento do tempo de incubação e da concentração de D-glucose. No entanto, o número de modificações detetado pelo método espectrofotométrico e por MALDI-TOF-MS foi discrepante. No método colorimétrico a exatidão na determinação do número de PAs formados por mole de proteínas depende de uma quantificação eficiente da proteína. Assim, as diferenças verificadas podem estar associadas a desvios na quantificação da proteína pelo método de Lowry. Este método ocorre em dois passos: 1) reação do íão cobre com ligações peptídicas sob condições alcalinas, com oxidação dos resíduos aromáticos das proteínas 2) reação do Cu^+ produzido pela oxidação das ligações peptídicas com o reagente de Folin-Ciocalteu.¹²⁴ No entanto Spears *et al.* verificaram que a apo-Trf tem uma elevada capacidade de ligar metais de transição incluindo o cobre.¹²⁹ Qian *et al.* verificaram também que os produtos de glicação tinham elevada capacidade de ligar cobre e ferro.¹³⁰ Sendo assim a disponibilidade do íão cobre para a reação com o reagente de Folin-Ciocalteu poderá apresentar variações de acordo com o nível de glicação e de apo-Trf funcional. A determinação por MALDI-TOF-MS é desta forma mais fiável pois a determinação das modificações é direta e como consequência mais sensível. O número de modificações encontradas por nano-HPLC-ESI-Ion Trap-MS/MS na apo-Trf incubada com D-glucose (0, 10, 100, 500) por 7 e 14 dias permitiram validar as conclusões obtidas por MALDI-TOF-MS. Os resultados obtidos assemelham-se ao

anteriormente descrito por Van Campenhout *et al.* e Goodarzi *et al.*.^{39, 116} Van Campenhout *et al.* adotou um procedimento espectrofotométrico semelhante ao utilizado no decorrer deste trabalho. No entanto para o cálculo da concentração de frutose-lisina foi utilizado um kit comercial baseado no soro humano.¹¹⁶ Goodarzi *et al.* utilizou o método colorimétrico baseado no ácido tiobarbitúrico, que hidrolisa as proteínas glicadas formando 5-hidroximetil furfural.³⁹ Contudo, em ambos os métodos a tendência verificada foi a mesma: aumento dos níveis de glicação com o aumento da concentração de glucose. Este facto está obviamente associado à maior disponibilidade do açúcar redutor para catalisar a glicação. Goodarzi *et al.* verificou ainda o aumento da glicação com o aumento do tempo de incubação.³⁹

Constatou-se que a evolução da glicação ocorrida na holo-Trf apresentava um comportamento semelhante ao descrito para a apo-Trf, contudo a extensão da reação foi ligeiramente reduzida. Esta variação poderá ser devida às alterações conformacionais que ocorrem na proteína com a ligação ao ferro. Para a apo-Trf os domínios de ligação ao ferro encontram-se numa conformação aberta, que se fecham por rotação rígida dos lóbulos aprisionando o ião férrico.¹³¹ Esta conformação fechada pode levar assim a uma diminuição de aminos livres passíveis de sofrer glicação. De notar que os espectros de nano-HPLC-ESI-Ion Trap-MS/MS obtidos para a holo-Trf apresentavam baixa qualidade e como consequência as pesquisas bioinformáticas não permitiram a identificação dos locais de glicação. Esta ocorrência pode estar associada a uma digestão triptica ineficiente. Evans *et al.* verificaram que a digestão triptica da holo-transferrina é muito menos eficiente quando comparada com a apo-Trf.¹³² A glicação pode ainda exacerbar esta ocorrência já que evita a clivagem junto às lisinas modificadas, aumentando desta forma o número de clivagens falhadas.^{89, 133} A presença de quantidades residuais de ferro na preparação da holo-Trf pode originar danos oxidativos na tripsina levando à perda de função. Por outro lado podem ocorrer danos oxidativos na tripsina pela holo-Trf glicada. Fujimoto *et al.* verificaram ainda que a holo-Trf apresentava um aumento significativo na produção de radicais superóxido e hidroxilo quando comparada com a apo-Trf.¹³⁴ Os radicais produzidos poderão induzir oxidação da tripsina inativando-a. Para superar estes problemas foram testadas algumas metodologias. Numa tentativa de remover o ferro e facilitar a digestão procedeu-se à acidificação com HCL para um pH<4, e ainda se utilizou deferiprona com a finalidade de ligar o ferro. Tentou-se ainda o enriquecimento dos péptidos glicados por cromatografia de afinidade com fenilboronato com e sem redução com boroidreto de

sódio, cuja finalidade é estabilizar o produto de Amadori. Estas metodologias não foram bem sucedidas pelo que não foi possível aprofundar a análise por MS da holo-Trf.

A análise por nano-HPLC-ESI-Ion Trap-MS/MS providenciou informação quanto à localização dos aminoácidos que sofreram modificação e quais as modificações ocorridas nas diferentes condições de incubação da apo-Trf. A modificação maioritariamente identificada compreende o aduto frutose-lisina. O aduto frutose-lisina consiste no produto inicial de glicação, que sofre rearranjos, oxidações, ciclizações e desidratações formando AGEs. A formação de AGEs requer longos períodos de incubação (semanas ou meses) e ainda espécies capazes de promover a oxidação.¹³⁵ Não sendo fornecidas estas condições não era esperado a formação de AGEs. Todas as modificações encontradas ocorreram em lisinas, no entanto era espectável surgirem modificações na arginina já que este aminoácido apresenta características semelhantes às da lisina em termos de carga, nucleoficidade e hidrofobicidade.⁴¹ A ausência de modificações nas argininas pode ser explicada pelo baixo teor desta aminoácido na proteína quando comparado com a lisina. A transferrina humana possui 26 argininas e 58 lisinas, o que corresponde respetivamente a 3,8% e 8,5% do total de aminoácidos. As representações dos locais de glicação na estrutura primária e terciária permitiram avaliar não só a localização dos aminoácidos modificados, mas também a sua proximidade com os resíduos envolvidos na ligação ao ferro. Verificou-se na estrutura primária a ocorrência de um maior número de modificações no lóbulo N após 7 dias de incubação com D-glucose. Após 14 dias de incubação, apesar de surgirem novas modificações no lóbulo C, o lóbulo N permanecia a compreender um maior número de modificações. Sendo assim pode-se concluir que o lóbulo N é mais suscetível a danos resultantes da glicação.

Para além da nucleoficidade foram verificados outros fatores de grande importância para a glicação. Para as lisinas, foi sugerido que as propriedades dos aminoácidos próximos determinam se esta é glicada ou não. Foi verificado na estrutura primária que a proximidade de outra lisina promove a glicação.¹³⁶ Resíduos de aspartato e argininas próximos das lisinas a nível tridimensional parecem também promover a glicação.¹³⁷ A proximidade de aminoácidos ácidos e aminoácidos carregados positivamente quer a nível da estrutura primária quer terciária, catalisam o rearranjo de Amadori, tornando assim a lisina mais reativa.¹³⁸ Pelo contrário, a formação de pontes de hidrogénio entre a lisina e outros aminoácidos promove a proteção destas.¹³⁶ Estas condições podem explicar o aparecimento de um maior número de modificações com o

aumento do período de incubação, já que algumas lisinas são mais passíveis de glicação do que outras.

Na incubação com 100 mM de D-glucose por 7 dias observaram-se 4 lisinas modificadas (K196, K206, K278 e K280), já para a apo-Trf incubada nas mesmas condições mas por 14 dias verificaram-se 5 lisinas modificadas (K103, K278, K280, K496 e K534). As lisinas K196 e K206 que foram observadas na amostra pré-incubada por 7 dias não foram detectadas na amostra incubada por 14 dias. O mesmo se verificou para as amostras incubadas com 500 mM, de D-glucose, na qual a glicação das lisinas 196 e 291 foi detectada na amostra incubada por 7 dias e não nas amostras incubadas por 14 dias. Este facto pode estar associado à reversibilidade do produto de Amadori. As diferenças encontradas com o aumento do tempo de incubação implicam que a reação não teria atingido o equilíbrio ao fim de 7 dias. As diferentes lisinas da proteína competem pela ligação à glucose, pelo que ao final de 7 dias podem formar-se adutos cuja cinética de formação seja mais rápida. No entanto, ao final de 14 dias, ou seja, mais próximo do ponto de equilíbrio, apesar de cineticamente mais lentos os novos adutos observados poderão ser mais estáveis. Sendo assim pode supor-se que o equilíbrio é menos favorável à formação de adutos nas lisinas 196 e 206 na amostra incubada por 14 dias com 100 mM de D-glucose, e nas lisinas 196 e 291 na amostra incubada com 500 mM de D-glucose. Como consequência, a abundância relativa destas modificações será diminuída, lavando a que não sejam identificadas por MSⁿ.

Uma outra característica abordada neste trabalho consistiu na avaliação da capacidade de ligação da transferrina glicada ao ião férrico. Esta proteína é capaz de ligar vários iões de metais (cobalto, cobre e ferro). Na perspetiva dos sistemas biológicos a ligação do ião férrico é a de maior importância, dado a elevada necessidade deste ião e os seus efeitos deletérios quando presente na sua forma livre. Esta ligação é altamente dependente do pH e da presença de um ião sinérgico, usualmente o ião bicarbonato (*in vivo*).¹³⁹⁻¹⁴¹ Van Campenhout *et al.* verificou que a ligação de ferro se encontrava comprometida de forma dependente dos níveis de glicação.¹²¹ Este autor incubou apo-Trf (2,5 g/l) com Ferro:NTA e com várias concentrações finais de ferro. A formação de complexos Fe-Trf foi seguida espectrofotometricamente a 470 nm durante 90 min.¹²¹ A metodologia adotada no decorrer deste trabalho assemelha-se à descrita por esta autor assim como os resultados obtidos. Tal como os resultados descritos por Van Campenhout, neste trabalho verificou-se uma tendência para a diminuição da saturação máxima da Trf com o aumento dos níveis de glucose utilizados na preparação

da transferrina glicada, no entanto a significância estatística só foi atingida para as concentrações de glucose correspondentes a 100 e 500 mM quando comparada com o controlo. Para além de se verificar que a saturação máxima da proteína era reduzida pelo aumento dos níveis de glicação, também se observou que a velocidade inicial de reação tendia a diminuir. Sendo assim, pode supor-se que a glicação estará associada a modificações estruturais que dificultam a ligação do íão férrico à proteína. A Trf sofre grandes alterações conformacionais para libertar ou ligar ferro, estas correspondem à abertura e fecho dos dois lóbulos e ainda à torção dos subdomínios N1-N2 e C1-C2.^{142,}
¹⁴³ Esta alteração ocorre por torção rígida dos subdomínios em torno de um conjunto de resíduos, que no lóbulo N consiste nos aminoácidos Thr93, Val246 e Pro247; já no lóbulo C os aminoácidos Ala 424, Gly425, Arg581, Ala 582 e Pro583.^{127, 144} Existem ainda locais de ligação ao ferro no lóbulo C (Asp392, Tyr426, Tyr 517 e His 585), e no lóbulo N (Asp63, Tyr95, Tyr188 e His249).^{145, 146} Após ligação do ferro há aminoácidos que formam pontes de hidrogénio entre si e estabilizam esta ligação. Estes têm vindo a ser associados às diferentes velocidades à qual a transferrina liberta o ferro. No lóbulo N a ponte de hidrogénio é formada entre a Lys206 e Lys296 não carregadas, já no lóbulo C esta di-lisina é substituída por três aminoácidos (Lys534, Arg632, Asp634).^{145, 147} Na incubação da apo-Trf as modificações que se destacaram foram as que ocorreram, em ambos os lóbulos, nos locais de estabilização do ferro após incubação por 7 e 14 dias. No lóbulo N ambas as lisinas (Lys206 e Lys296) encontram-se modificadas por formação do aduto frutose-lisina, na apo-Trf incubada com 100 e 500 mM de D-glucose por 7 dias e 500 mM por 14 dias (Fig. 12 a)). No lóbulo C a lisina 534 também se encontrava modificada por formação do aduto frutose-lisina (Fig. 12 b)) nas amostras incubadas com 500 mM de D-glucose por 7 dias e com 100 e 500 mM de D-glucose por 14 dias. Dado que ambas as lisinas no lóbulo C se encontram modificadas não haverá formação da ponte de hidrogénio, não ocorrendo assim estabilização da ligação do ferro à transferrina. O mesmo acontecerá no lóbulo C, já que é a lisina 534 que se encontra modificada. Um outro facto importante consiste no posicionamento destas lisinas na estrutura terciária. Na estrutura tridimensional da proteína verificou-se que estas se encontram orientadas para o centro da cavidade onde se liga o ferro, e relativamente próximas dos sítios de ligação ao ferro. Sendo assim, a formação de adutos nestes resíduos poderá impedir ou dificultar fisicamente o acesso do ferro à cavidade onde ocorre a ligação. Estes resultados estão de acordo com os resultados anteriormente discutidos onde se verificou que o aumento dos níveis de glicação promovia uma

diminuição da capacidade ligante de ferro e ainda à diminuição dos máximos de saturação com os diferentes tempos de incubação. As restantes modificações encontradas não parecem estar diretamente relacionadas com a ligação do ferro, no entanto devido à grande alteração estrutural entre a apo-Trf e a holo-Trf não se sabe qual a relevância dos restantes aminoácidos na estabilização das diferentes conformações.

Um outro parâmetro importante na manutenção da homeostase do ferro consiste na interação da Trf com o seu recetor (RTrf), que medeia a internalização celular do ferro. Cheng *et al.* e Wally *et al.* verificaram por cristalografia a interação de ambos os lóbulos da Trf com o recetor, e ainda que o lóbulo C possui uma afinidade maior para o RTrf e propuseram que este promove a aproximação do lóbulo N (com menos afinidade para o RTrf).^{100, 127} Uma alteração no lóbulo N permite que este seja capturado pelo RTrf e permaneça ligado à superfície do RTrf. Nos mesmos estudos, foram ainda propostos os aminoácidos que participam na formação do complexo Trf-RTrf. Estes compreendem no lóbulo N os resíduos 71-74 e 142-145, e no lóbulo C os resíduos 349, 352-360 e 365-372.^{100, 127} Ao mapear estes aminoácidos na estrutura tridimensional denotou-se que uma das lisinas modificadas (K312) se encontrava próxima da sequência 71-74 (Fig. 12 c). Para além da sua proximidade a lisina possuía a mesma orientação que o resíduo de tirosina. Sendo assim a modificação pode, desta forma, dificultar a ligação do lóbulo N, diminuindo ainda mais a afinidade deste lóbulo para com o RTrf.

Estas observações *in vitro* têm implicações *in vivo* pois já foi verificado que a glicação da transferrina em pacientes com diabetes melito encontra-se aproximadamente 5 vezes aumentada.¹⁴⁸ Apesar de não se ter verificado modificações na apo-Trf incubada com 10 mM de D-glucose por 7 e 14 dias, ou seja, dentro da gama fisiopatológica, demonstrou-se que a glicação aumenta de forma independente da concentração de glucose com o tempo de exposição. No decorrer deste trabalho, com incubação máxima com glucose por 14 dias verificou-se que o produto inicial de glicação (frutose-lisina) foi o responsável pela perda de função da Trf. Sendo assim, a hiperglicemia provocada pela diabetes, sobretudo a longo prazo, pode levar a ocorrência destas modificações promovendo a perda de função da Trf. A diminuição da capacidade de ligação ao ferro pela Trf pode levar a um aumento de ferro na sua forma reativa. Este íão, por sua vez, poderá catalisar a formação de AGEs (causando danos irreversíveis na proteína), promover o aumento da peroxidação lipídica verificada na diabetes e por fim o característico aumento de stress oxidativo nesta patologia.

9. Conclusão e perspectivas futuras

Conclusão

A glicação de proteínas no soro humano tem suscitado interesse a vários investigadores devido ao aumento exponencial da incidência e prevalência da diabetes melito. Vários estudos incidiram sobre os mecanismos envolvidos nesta patologia, tendo-se verificado a presença de uma relação entre a hiperglicemia e a glicação de várias proteínas. Os AGE encontram-se fortemente associados com grande parte dos sintomas mais graves da diabetes melito. No entanto, a formação de produtos iniciais de glicação em determinadas proteínas pode levar à sua disfunção. Por outro lado, verificou-se a presença de alterações no metabolismo do ferro com o desenvolvimento desta patologia. A transferrina do soro humano liga virtualmente todo o ferro livre no plasma, e através da corrente sanguínea distribui este ferro por todo o organismo. No decorrer deste trabalho confirmou-se *in vitro* a suscetibilidade desta proteína em sofrer glicação e a diminuição da sua capacidade de ligação ao ferro.

O estudo *in vitro* de apo- e holo-Trf permitiu verificar que a extensão da glicação aumenta, quando aumentado o tempo de exposição e/ou a concentração de glucose. Verificou-se ainda que a capacidade da transferrina ligar ferro (níveis máximos de saturação) apresentava uma tendência decrescente, implicando assim uma diminuição funcional desta proteína. Estas foram realizadas espectrofotometricamente e para a apo-Trf confirmadas por MS. A representação das modificações obtidas pela análise por MS na estrutura primária da Trf permitiu verificar uma distribuição não uniforme das modificações pelos lóbulos N e C. O lóbulo N apresentava um maior número de modificações, concluindo-se assim uma maior suscetibilidade deste para a glicação. Entre as lisinas modificadas destacaram-se as Lys 206 e 296 no lóbulo N e a Lys 534 no lóbulo C, dado que participam na estabilização da ligação do ferro. As Lys 206 e 296 não carregadas formam uma ponte de hidrogénio entre os subdomínios N1 e N2 estabilizando o lóbulo N na holo-Trf. O mesmo se verifica para a Lys 534 que se encontra no subdomínio C2 e forma ponte de hidrogénio com a Arg 632 e Asp 634 no subdomínio C2. Para além da função estabilizadora, a nível tridimensional, estas lisinas encontram-se na cavidade onde se liga o ferro. A glicação destas três lisinas pode então explicar a diminuição na capacidade de ligação do ferro pela Trf. A representação tridimensional demonstrou que a modificação na lisina 312, possui a mesma orientação

que a tirosina 71, podendo assim promover a diminuição da afinidade do lóbulo N da Trf com o respetivo recetor.

Perspetivas futuras

A caracterização estrutural da apo-Trf glicada foi executada com sucesso, no entanto a análise de holo-Trf glicada não. A análise por MS da holo-Trf é essencial de forma a se verificar se a glicação promove a libertação do ião férrico. Por outro lado, só nesta conformação é que a proteína se liga ao RTrf, sendo assim é importante verificar se existem outros aminoácidos passíveis de glicação, e se estes são importantes, por exemplo, na ligação ao recetor. É portanto necessário o desenvolvimento de uma metodologia ou otimização das metodologias já existentes, de forma a obter a caracterização da holo-Trf glicada. Para isso a digestão da holo-Trf tem de ser melhorada, recorrendo a técnicas que permitam a remoção de ferro ou ainda antioxidantes de forma a prevenir a inibição oxidativa da protéase utilizada no estudo.

Numa primeira instância apenas quatro das onze modificações encontradas tinham importância na funcionalidade da Trf. No entanto esta proteína sofre grandes alterações conformacionais quando liga o ferro. Sendo assim uma análise computacional de forma a se verificar qual o efeito da glicação nos restantes aminoácidos modificados, poderia permitir uma melhor explicação dos efeitos da glicação na afinidade desta proteína para o ferro.

A associação inequívoca das modificações encontradas á diabetes melito, só poderá ser feita transpondo este estudo para *in vivo*. Os estudos *in vivo* permitirão avaliar potenciais diferenças entre a glicação da Trf *in vivo* e *in vitro*, que podem também ser relevantes para a diminuição funcional desta proteína. A deteção de Trf glicada em pacientes com diabetes poderá permitir ainda uma correlação com o aparecimento de NTBI. Adicionalmente, detetar esta ocorrência em pacientes hemocromatósicos que tenham desenvolvido diabetes, permitirá verificar se existe alguma correlação entre os danos glicoxidativos da transferrina, a sua saturação e a ocorrência de NTBI.

10.Referências

1. Kuroki, T., K. Isshiki, and G.L. King, *Oxidative stress: the lead or supporting actor in the pathogenesis of diabetic complications*. J. Am. Soc. Nephrol., 2003. **14**(8 Suppl 3): S216-220.
2. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol. Rev., 2002. **82**(1): 47-95.
3. Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur, and J. Telser, *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int. J. Biochem. Cell Biol., 2007. **39**(1): 44-84.
4. Watkins, J.B., A.C. Maritim, and R.A. Sanders, *Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review*. J. Biochem. Mol. Toxic., 2003. **17**(1): 24-38.
5. Misciagna, G., G. De Michele, and M. Trevisan, *Non enzymatic glycated proteins in the blood and cardiovascular disease*. Curr. Pharm. Des., 2007. **13**(36): 3688-3695.
6. Ulrich, P. and A. Cerami, *Protein glycation, diabetes, and aging*. Recent Prog. Horm. Res., 2001. **56**: 1-21.
7. Fernández-Real, J.M., G. Peñarroja, A. Castro, F. García-Bragado, I. Hernández-Aguado, and W. Ricart, *Blood letting in high-ferritin type 2 diabetes: Effects on insulin sensitivity and β -cell function*. Diabetes, 2002. **51**(4): 1000-1004.
8. Sempos, C.T., A.C. Looker, R.E. Gillum, D.L. McGee, C.V. Vuong, and C.L. Johnson, *Serum ferritin and death from all causes and cardiovascular disease: the NHANES II Mortality Study*. National Health and Nutrition Examination Study. Ann. Epidemiol., 2000. **10**(7): 441-448.
9. Nunez, M.T., M.A. Garate, M. Arredondo, V. Tapia, and P. Munoz, *The cellular mechanisms of body iron homeostasis*. Biol. Res., 2000. **33**(2): 133-142.
10. Wang, J. and K. Pantopoulos, *Regulation of cellular iron metabolism*. Biochem. J., 2011. **434**(3): 365-381.
11. Graham, G., G.W. Bates, E.A. Rachmilewitz, and C. Hershko, *Nonspecific serum iron in thalassemia: Quantitation and chemical reactivity*. Am. J. Hematol., 1979. **6**(3): 207-217.
12. Gutteridge, J.M.C., D.A. Rowley, E. Griffiths, and B. Halliwell, *Low-molecular-weights iron complexes and oxygen radical reactions in idiopathic haemochromatosis*. Clin. Sci., 1985. **68**(4): 463-467.
13. Grootveld, M., J.D. Bell, B. Halliwell, O.I. Aruoma, A. Bomford, and P.J. Sadler, *Non-transferrin-bound iron in plasma or serum from patients with idiopathic hemochromatosis. Characterization by high performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopy*. J. Biol. Chem., 1989. **264**(8): 4417-4422.
14. Breuer, W., C. Hershko, and Z.I. Cabantchik, *The importance of non-transferrin bound iron in disorders of iron metabolism*. Transfus. Sci., 2000. **23**(3): 185-192.
15. De Feo, T.M., S. Fargion, L. Duca, B.M. Cesana, L. Boncinelli, P. Lozza, M.D. Cappellini, and G. Fiorelli, *Non-transferrin-bound iron in alcohol abusers*. Alcohol. Clin. Exp. Res., 2001. **25**(10): 1494-1499.
16. Van Campenhout, A., C. Van Campenhout, A.R. Lagrou, G. Moorkens, C. De Block, and B. Manuel-y-Keenoy, *Iron-binding antioxidant capacity is impaired in diabetes mellitus*. Free Radical Biol. Med., 2006. **40**(10): 1749-1755.
17. Suleiman, M., R. Asleh, Z.I. Cabantchik, W. Breuer, D. Aronson, A. Suleiman, R. Miller-Lotan, H. Hammerman, and A.P. Levy, *Serum chelatable redox-active iron is an independent predictor of mortality after myocardial infarction in individuals with diabetes*. Diabetes care, 2004. **27**(11): 2730-2732.

18. Lee, D.H., D.Y. Liu, D.R. Jacobs, Jr., H.R. Shin, K. Song, I.K. Lee, B. Kim, and R.C. Hider, *Common presence of non-transferrin-bound iron among patients with type 2 diabetes*. Diabetes care, 2006. **29**(5): 1090-1095.
19. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes care, 2011. **34 Suppl 1**: S62-69.
20. Mayfield, J., *Diagnosis and classification of diabetes mellitus: New criteria*. Am. Fam. Physician, 1998. **58**(6): 1355-1362.
21. Holt, T.A., S. Kumar, and P.J. Watkins, *ABC of diabetes*. 6th ed. ABC series. 2010, Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell/BMJ. viii, 104 p.
22. Gaw, A., *Clinical biochemistry : an illustrated colour text*. 4th ed. 2008, Edinburgh ; London: Churchill Livingstone. p.
23. Atkinson, M.A. and G.S. Eisenbarth, *Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment*. Lancet, 2001. **358**(9277): 221-229.
24. Joslin, E.P. and C.R. Kahn, *Joslin's diabetes mellitus*. 14th ed. 2005, Philadelphia, Pa.: Lippincott Williams & Wilkins. xiv, 1209 p.
25. Kahn, S.E., R.L. Prigeon, R.S. Schwartz, W.Y. Fujimoto, R.H. Knopp, J.D. Brunzell, and D. Porte, *Obesity, body fat distribution, insulin sensitivity and islet α -cell function as explanations for metabolic diversity*. J. Nutr., 2001. **131**(2): 354s-360s.
26. Feinglos, M.N. and M.A. Bethel, *Type 2 diabetes mellitus : an evidence-based approach to practical management*. Contemporary endocrinology. 2008, Totowa, NJ: Humana Press. xiii, 474 p.
27. Son, S.M., M.K. Whalin, D.G. Harrison, W.R. Taylor, and K.K. Griendling, *Oxidative stress and diabetic vascular complications*. Curr. Diab. Rep., 2004. **4**(4): 247-252.
28. Zavodnik, I.B., K. Dremza, E.A. Lapshina, and V.T. Cheshchevik, *Diabetes mellitus: Metabolic effects and oxidative stress*. Biol. Membr., 2011. **28**(2): 83-94.
29. Griffiths, H., *Chemical Modifications of Biomolecules by Oxidants; Reactions, Processes*, T. Grune, Editor. 2005, Springer Berlin / Heidelberg. 71-160.
30. Valko, M., M. Izakovic, M. Mazur, C.J. Rhodes, and J. Telser, *Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence*. Mol. Cell. Biochem., 2004. **266**(1-2): 37-56.
31. Davies, K.J., *Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems*. IUBMB life, 2000. **50**(4-5): 279-289.
32. Kalmar, B. and L. Greensmith, *Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress*. Adv. Drug Delivery Rev., 2009. **61**(4): 310-318.
33. Powers, S.K. and M.J. Jackson, *Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production*. Physiol. Rev., 2008. **88**(4): 1243-1276.
34. Giacco, F. and M. Brownlee, *Oxidative Stress and Diabetic Complications*. Circ. Res., 2010. **107**(9): 1058-1070.
35. Mohora M., G.M., Muscurel C., Duță C., Totan A. , *The sources and the targets of oxidative stress in the etiology of diabetic complications*. Rom. J. Biophys., 2007. **17**(2): 63-84.
36. Evans, J.L., I.D. Goldfine, B.A. Maddux, and G.M. Grodsky, *Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes*. Endocr. Rev., 2002. **23**(5): 599-622.

37. Packer, L., *The Role of Antioxidative Treatment in Diabetes-Mellitus - This Meeting Was Held in Frankfurt-Am-Main, Germany*. Diabetologia, 1993. **36**(11): 1212-1213.
38. Hoffmann, R. and A. Frolov, *Identification and relative quantification of specific glycation sites in human serum albumin*. Anal. Bioanal. Chem., 2010. **397**(6): 2349-2356.
39. Goodarzi, M.T., M. Rashidi, and M. Rezaei, *Study of Nonenzymatic Glycation of Transferrin and its Effect on Iron-Binding Antioxidant Capacity*. Iran. J. Basic. Med. Sci., 2010. **13**(4): 194-199.
40. Bunn, H.F., R. Shapiro, M. McManus, L. Garrick, M.J. McDonald, P.M. Gallop, and K.H. Gabbay, *Structural heterogeneity of human hemoglobin A due to nonenzymatic glycosylation*. J. Biol. Chem., 1979. **254**(10): 3892-3898.
41. Lesk, A.M., *Introduction to protein architecture : the structural biology of proteins*. 2001, Oxford ; New York: Oxford University Press. xii, 347 p.
42. Maillard, L.C., *The action of amino acids on sugar; The formation of melanoidin by a methodic route*. C. R. Hebd. Acad. Sci., 1912. **154**: 66-68.
43. Koenig, R.J., C.M. Peterson, C. Kilo, A. Cerami, and J.R. Williamson, *Hemoglobin A1c as an indicator of the degree of glucose intolerance in diabetes*. Diabetes, 1976. **25**(3): 230-232.
44. Koenig, R.J., S.H. Blobstein, and A. Cerami, *Structure of carbohydrate of hemoglobin A1c*. J. Biol. Chem., 1977. **252**(9): 2992-2997.
45. Bunn, H.F., D.N. Haney, K.H. Gabbay, and P.M. Gallop, *Further identification of the nature and linkage of the carbohydrate in hemoglobin A1c*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975. **67**(1): 103-109.
46. Monnier, V.M. and A. Cerami, *Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins*. Science, 1981. **211**(4481): 491-493.
47. Fuster, V., E.J. Topol, and E.G. Nabel, *Atherothrombosis and coronary artery disease*. 2nd ed. 2005, Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. xxv, 1636 p.
48. Dills, W.L., *Protein Fructosylation - Fructose and the Maillard Reaction*. Am. J. Clin. Nutr., 1993. **58**(5): S779-S787.
49. Popova, E.A.M., R. S.; Odjakova, M. K., *Non enzymatic glycosylation and deglycating enzymes*. Biotechnol. Biotec. Eq., 2010. **24**(3).
50. Ahmed, N., O.K. Argirov, H.S. Minhas, C.A. Cordeiro, and P.J. Thornalley, *Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Nepsilon-carboxymethyl-lysine- and Nepsilon-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin*. Biochem. J., 2002. **364**(Pt 1): 1-14.
51. Thornalley, P.J., S. Battah, N. Ahmed, N. Karachalias, S. Agalou, R. Babaei-Jadidi, and A. Dawnay, *Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry*. Biochem. J., 2003. **375**(Pt 3): 581-592.
52. Ahmed, N. and A.J. Furth, *Failure of common glycation assays to detect glycation by fructose*. Clin. Chem., 1992. **38**(7): 1301-1303.
53. Jaleel, A., P. Halvatsiotis, B. Williamson, P. Juhasz, S. Martin, and K.S. Nair, *Identification of amadori-modified plasma proteins in type 2 diabetes and the effect of short-term intensive insulin treatment*. Diabetes care, 2005. **28**(3): 645-652.

54. Higai, K., A. Shimamura, and K. Matsumoto, *Amadori-modified glycated albumin predominantly induces E-selectin expression on human umbilical vein endothelial cells through NADPH oxidase activation*. Clin. Chim. Acta, 2006. **367**(1-2): 137-143.
55. Goh, S.Y. and M.E. Cooper, *Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(4): 1143-1152.
56. Aebersold, R. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics*. Nature, 2003. **422**(6928): 198-207.
57. Lei, Z., D.V. Huhman, and L.W. Sumner, *Mass spectrometry strategies in metabolomics*. J. Biol. Chem., 2011. **286**(29): 25435-25442.
58. Steen, H. and M. Mann, *The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2004. **5**(9): 699-711.
59. Hoffmann, E.d. and V. Stroobant, *Mass spectrometry: principles and applications*. 3rd ed. 2007, Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ: J. Wiley. xii, 489 p.
60. Ekman, R., *Mass spectrometry: instrumentation, interpretation, and applications*. Wiley-Interscience series on mass spectrometry. 2009, Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons. xvi, 371 p., 316 p. of plates.
61. Bonk, T. and A. Humeny, *MALDI-TOF-MS analysis of protein and DNA*. Neuroscientist, 2001. **7**(1): 6-12.
62. Yates, J.R., C.I. Ruse, and A. Nakorchevsky, *Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications*. Annu. Rev. Biomed. Eng., 2009. **11**: 49-79.
63. Aebersold, R., *Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy*. Nat. Biotechnol., 2010. **28**(7): 12p.
64. Hager, J.W. and J.C. Le Blanc, *High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a new quadrupole/linear ion trap instrument*. J. Chromatogr. A, 2003. **1020**(1): 3-9.
65. Hu, Q., R.J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, and R. Graham Cooks, *The Orbitrap: a new mass spectrometer*. J. Mass Spectrom., 2005. **40**(4): 430-443.
66. Makarov, A., *Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis*. Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.), 2000. **72**(6): 1156-1162.
67. Syka, J.E., J.A. Marto, D.L. Bai, S. Horning, M.W. Senko, J.C. Schwartz, B. Ueberheide, B. Garcia, S. Busby, T. Muratore, J. Shabanowitz, and D.F. Hunt, *Novel linear quadrupole ion trap/FT mass spectrometer: performance characterization and use in the comparative analysis of histone H3 post-translational modifications*. J. Proteome Res., 2004. **3**(3): 621-626.
68. Morris, H.R., T. Paxton, A. Dell, J. Langhorne, M. Berg, R.S. Bordoli, J. Hoyes, and R.H. Bateman, *High sensitivity collisionally-activated decomposition tandem mass spectrometry on a novel quadrupole/orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer*. Rapid Commun. Mass Spectrom., 1996. **10**(8): 889-896.
69. Boyle, J.G., C.M. Whitehouse, and J.B. Fenn, *An ion-storage time-of-flight mass spectrometer for analysis of electrospray ions*. Rapid Commun. Mass Spectrom., 1991. **5**(9): 400-405.
70. Odetti, P.R., A. Borgoglio, A. De Pascale, R. Rolandi, and L. Adezati, *Prevention of diabetes-increased aging effect on rat collagen-linked fluorescence by aminoguanidine and rutin*. Diabetes, 1990. **39**(7): 796-801.

71. Lapolla, A., D. Fedele, and P. Traldi, *The role of mass spectrometry in the study of non-enzymatic protein glycation in diabetes*. Mass Spectrom. Rev., 2000. **19**(5): 279-304.
72. Guedes, S., R. Vitorino, M.R. Domingues, F. Amado, and P. Domingues, *Glycation and oxidation of histones H2B and H1: in vitro study and characterization by mass spectrometry*. Anal. Bioanal. Chem., 2011. **399**(10): 3529-3539.
73. Brady, L.J., T. Martinez, and A. Balland, *Characterization of nonenzymatic glycation on a monoclonal antibody*. Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.), 2007. **79**(24): 9403-9413.
74. Carulli, S., C.D. Calvano, F. Palmisano, and M. Pischetsrieder, *MALDI-TOF MS characterization of glycation products of whey proteins in a glucose/galactose model system and lactose-free milk*. J. Agric. Food Chem., 2011. **59**(5): 1793-1803.
75. Argirov, O.K., B. Lin, P. Olesen, and B.J. Ortwerth, *Isolation and characterization of a new advanced glycation endproduct of dehydroascorbic acid and lysine*. Biochim. Biophys. Acta, 2003. **1620**(1-3): 235-244.
76. Lapolla, A., D. Fedele, R. Seraglia, S. Catinella, L. Baldo, R. Aronica, and P. Traldi, *A new effective method for the evaluation of glycated intact plasma proteins in diabetic subjects*. Diabetologia, 1995. **38**(9): 1076-1081.
77. Priego Capote, F. and J.C. Sanchez, *Strategies for proteomic analysis of non-enzymatically glycated proteins*. Mass Spectrom. Rev., 2009. **28**(1): 135-146.
78. Kislinger, T., A. Humeny, C.C. Peich, C.M. Becker, and M. Pischetsrieder, *Analysis of protein glycation products by MALDI-TOF/MS*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 2005. **1043**: 249-259.
79. Niwa, T., *Mass spectrometry for the study of protein glycation in disease*. Mass Spectrom. Rev., 2006. **25**(5): 713-723.
80. Hunter, S.J., A.C. Boyd, F.P.M. O'Harte, A.M. McKillop, M.I. Wiggam, M.H. Mooney, J.T. McCluskey, J.R. Lindsay, C.N. Ennis, R. Gamble, B. Sheridan, C.R. Barnett, H. McNulty, P.M. Bell, and P.R. Flatt, *Demonstration of Glycated Insulin in Human Diabetic Plasma and Decreased Biological Activity Assessed by Euglycemic-Hyperinsulinemic Clamp Technique in Humans*. Diabetes, 2003. **52**(2): 492-498.
81. Oliver, C.M., *Insight into the Glycation of Milk Proteins: An ESI- and MALDI-MS Perspective (Review)*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 2011. **51**(5): 410-431.
82. Ledesma-Osuna, A.I., G. Ramos-Clamont, and L. Vazquez-Moreno, *Characterization of bovine serum albumin glycated with glucose, galactose and lactose*. Acta Biochim. Pol., 2008. **55**(3): 491-497.
83. Barnaby, O.S., C. Wa, R.L. Cerny, W. Clarke, and D.S. Hage, *Quantitative analysis of glycation sites on human serum albumin using (16)O/(18)O-labeling and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Clin. Chim. Acta, 2010. **411**(15-16): 1102-1110.
84. Arif, B., J.M. Ashraf, Moinuddin, J. Ahmad, Z. Arif, and K. Alam, *Structural and immunological characterization of Amadori-rich human serum albumin: Role in diabetes mellitus*. Arch. Biochem. Biophys., 2012. **522**(1): 17-25.
85. Kaschak, T., D. Boyd, and B. Yan, *Characterization of glycation in an IgG1 by capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate and mass spectrometry*. Anal. Biochem., 2011. **417**(2): 256-263.

86. Muthenna, P., C. Akileshwari, M. Saraswat, and G. Bhanuprakash Reddy, *Inhibition of advanced glycation end-product formation on eye lens protein by rutin*. Br. J. Nutr., 2012. **107**(7): 941-949.
87. Ramírez-Boo, M., F. Priego-Capote, A. Hainard, F. Gluck, P. Burkhard, and J.C. Sanchez, *Characterization of the glycosylated human cerebrospinal fluid proteome*. J. Proteomics., 2012. **75**(15): 4766-4782.
88. Li, Y., U. Pfüller, E.L. Larsson, H. Jungvid, I. Galaev, and B. Mattiasson, *Separation of mistletoe lectins based on the degree of glycosylation using boronate affinity chromatography*. J. Chromatogr. A, 2001. **925**(1-2): 115-121.
89. Lapolla, A., D. Fedele, R. Reitano, N.C. Arico, R. Seraglia, P. Traldi, E. Marotta, and R. Tonani, *Enzymatic digestion and mass spectrometry in the study of advanced glycation end products/peptides*. J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2004. **15**(4): 496-509.
90. Wa, C., R.L. Cerny, W.A. Clarke, and D.S. Hage, *Characterization of glycation adducts on human serum albumin by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Clin. Chim. Acta, 2007. **385**(1-2): 48-60.
91. Zhang, Q., N. Tang, J.W. Brock, H.M. Mottaz, J.M. Ames, J.W. Baynes, R.D. Smith, and T.O. Metz, *Enrichment and analysis of nonenzymatically glycosylated peptides: boronate affinity chromatography coupled with electron-transfer dissociation mass spectrometry*. J. Proteome Res., 2007. **6**(6): 2323-2330.
92. Perkins, D.N., D.J. Pappin, D.M. Creasy, and J.S. Cottrell, *Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data*. Electrophoresis, 1999. **20**(18): 3551-3567.
93. Dülcks, T. and R. Juraschek, *Electrospray as an ionisation method for mass spectrometry*. J. Aerosol Sci., 1999. **30**(7): 927-943.
94. Ciccoli, L., S. Leoncini, C. Signorini, and M. Comporti, *Iron and Erythrocytes: Physiological and Pathophysiological Aspects; Oxidants in Biology*, G. Valacchi and P.A. Davis, Editors. 2008, Springer Netherlands. 167-181.
95. Andrews, N.C., *Disorders of iron metabolism*. N. Engl. J. Med., 1999. **341**(26): 1986-1995.
96. Barton, J.C., *Handbook of iron overload disorders*. 2010, Cambridge ; New York: Cambridge University Press. ix, 376 p.
97. Robert, S. *Intestinal Iron Absorption*. SciTopics 2010, June 9 [cited 2012 28 January]; Available from: http://www.scitopics.com/Intestinal_Iron_Absorption.html.
98. Zalups, R.K. and D.J. Koropatnick, *Cellular and molecular biology of metals*. 2010, Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis Group. x, 430 p.
99. Tomas, G., *Cellular iron: Ferroportin is the only way out*. Cell Metab., 2005. **1**(3): 155-157.
100. Cheng, Y., O. Zak, P. Aisen, S.C. Harrison, and T. Walz, *Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex*. Cell, 2004. **116**(4): 565-576.
101. Jiang, R., J. Ma, A. Ascherio, M.J. Stampfer, W.C. Willett, and F.B. Hu, *Dietary iron intake and blood donations in relation to risk of type 2 diabetes in men: a prospective cohort study*. Am. J. Clin. Nutr., 2004. **79**(1): 70-75.
102. Fernández-Real, J.M., A. López-Bermejo, and W. Ricart, *Iron stores, blood donation, and insulin sensitivity and secretion*. Clin. Chem., 2005. **51**(7): 1201-1205.
103. McClain, D.A., D. Abraham, J. Rogers, R. Brady, P. Gault, R. Ajioka, and J.P. Kushner, *High prevalence of abnormal glucose homeostasis secondary to*

- decreased insulin secretion in individuals with hereditary haemochromatosis.* Diabetologia, 2006. **49**(7): 1661-1669.
104. Cooksey, R.C., H.A. Jouihan, R.S. Ajioka, M.W. Hazel, D.L. Jones, J.P. Kushner, and D.A. McClain, *Oxidative stress, beta-cell apoptosis, and decreased insulin secretory capacity in mouse models of hemochromatosis.* Endocrinology, 2004. **145**(11): 5305-5312.
 105. Tiedge, M., S. Lortz, J. Drinkgern, and S. Lenzen, *Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells.* Diabetes, 1997. **46**(11): 1733-1742.
 106. Andrews, N.C., *The iron transporter DMT1.* Int. J. Biochem. Cell Biol., 1999. **31**(10): 991-994.
 107. Dandona, P., M.A.M. Hussain, and Z. Varghese, *Insulin resistance and iron overload.* Ann. Clin. Biochem., 1983. **20**(2): 77-79.
 108. Ford, E.S. and M.E. Cogswell, *Diabetes and serum ferritin concentration among U.S. adults.* Diabetes care, 1999. **22**(12): 1978-1983.
 109. Snowdon, D.A. and R.L. Phillips, *Does a vegetarian diet reduce the occurrence of diabetes?* Am. J. Public Health, 1985. **75**(5): 507-512.
 110. Schulze, M.B., J.E. Manson, W.C. Willett, and F.B. Hu, *Processed meat intake and incidence of Type 2 diabetes in younger and middle-aged women.* Diabetologia, 2003. **46**(11): 1465-1473.
 111. Van Dam, R.M., W.C. Willett, E.B. Rimm, M.J. Stampfer, and F.B. Hu, *Dietary fat and meat intake in relation to risk of type 2 diabetes in men.* Diabetes care, 2002. **25**(3): 417-424.
 112. Jehn, M.L., E. Guallar, J.M. Clark, D. Couper, B.B. Duncan, C.M. Ballantyne, R.C. Hoogeveen, Z.L. Harris, and J.S. Pankow, *A prospective study of plasma ferritin level and incident diabetes: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study.* Am. J. Epidemiol., 2007. **165**(9): 1047-1054.
 113. Bofill, C., J. Joven, J. Bages, E. Vilella, T. Sans, P. Cavalle, R. Miralles, J. Llobet, and J. Camps, *Response to repeated phlebotomies in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus.* Metabolism., 1994. **43**(5): 614-620.
 114. Brissot, P., M. Ropert, C. Le Lan, and O. Loreal, *Non-transferrin bound iron: a key role in iron overload and iron toxicity.* Biochim. Biophys. Acta, 2012. **1820**(3): 403-410.
 115. Leoncini, S., V. Rossi, C. Signorini, I. Tanganelli, M. Comporti, and L. Ciccoli, *Oxidative stress, erythrocyte ageing and plasma non-protein-bound iron in diabetic patients.* Free Radic. Res. Commun., 2008. **42**(8): 716-724.
 116. Van Campenhout, A., C.M. Van Campenhout, A.R. Lagrou, and B. Manuel-Y-Keenoy, *Transferrin modifications and lipid peroxidation: Implications in diabetes mellitus.* Free Radic. Res., 2003. **37**(10): 1069-1077.
 117. Gomme, P.T., K.B. McCann, and J. Bertolini, *Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions.* Drug Discov. Today, 2005. **10**(4): 267-273.
 118. Crichton, R.R. and J.R. Boelaert, *Inorganic biochemistry of iron metabolism : from molecular mechanisms to clinical consequences.* 2nd ed. 2001, Chichester ; New York: Wiley. xxii, 326 p., 316 p. of plates.
 119. MacGillivray, R.T., E. Mendez, S.K. Sinha, M.R. Sutton, J. Lineback-Zins, and K. Brew, *The complete amino acid sequence of human serum transferrin.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1982. **79**(8): 2504-2508.
 120. del Castillo Busto, M.E., M. Montes-Bayon, E. Blanco-Gonzalez, J. Meija, and A. Sanz-Medel, *Strategies to study human serum transferrin isoforms using integrated liquid chromatography ICPMS, MALDI-TOF, and ESI-Q-TOF*

- detection: application to chronic alcohol abuse.* Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.), 2005. **77**(17): 5615-5621.
121. Van Campenhout, A., C. Van Campenhout, A.R. Lagrou, and B. Manuel-Y-Keenoy, *Effects of in vitro glycation on Fe³⁺ binding and Fe³⁺ isoforms of transferrin.* Clin. Chem., 2004. **50**(9): 1640-1649.
 122. Van Campenhout, A., C. Van Campenhout, Y.S. Olyslager, O. Van Damme, A.R. Lagrou, and B. Manuel-y-Keenoy, *A novel method to quantify in vivo transferrin glycation: Applications in diabetes mellitus.* Clin. Chim. Acta, 2006. **370**(1-2): 115-123.
 123. Qian, Z.M., H. Li, H. Sun, and K. Ho, *Targeted Drug Delivery via the Transferrin Receptor-Mediated Endocytosis Pathway.* Pharmacol. Rev., 2002. **54**(4): 561-587.
 124. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall, *Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.* J. Biol. Chem., 1951. **193**(1): 265-275.
 125. Johnson, R.N., P.A. Metcalf, and J.R. Baker, *Fructosamine - a New Approach to the Estimation of Serum Glycosylprotein - an Index of Diabetic Control.* Clin. Chim. Acta, 1983. **127**(1): 87-95.
 126. Tagami, U., S. Akashi, T. Mizukoshi, E. Suzuki, and K. Hirayama, *Structural studies of the Maillard reaction products of a protein using ion trap mass spectrometry.* J Mass Spectrom, 2000. **35**(2): 131-138.
 127. Wally, J., P.J. Halbrooks, C. Vornrhein, M.A. Rould, S.J. Everse, A.B. Mason, and S.K. Buchanan, *The crystal structure of iron-free human serum transferrin provides insight into inter-lobe communication and receptor binding.* J. Biol. Chem., 2006. **281**(34): 24934-24944.
 128. Moreland, J.L., A. Gramada, O.V. Buzko, Q. Zhang, and P.E. Bourne, *The Molecular Biology Toolkit (MBT): a modular platform for developing molecular visualization applications.* BMC bioinformatics, 2005. **6**: 21.
 129. Spears, D.R. and J.B. Vincent, *Copper binding and release by immobilized transferrin: a new approach to heavy metal removal and recovery.* Biotechnol. Bioeng., 1997. **53**(1): 1-9.
 130. Qian, M., M. Liu, and J.W. Eaton, *Transition metals bind to glycated proteins forming redox active "glycochelates": implications for the pathogenesis of certain diabetic complications.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 1998. **250**(2): 385-389.
 131. Mason, A.B., G.L. Judson, M.C. Bravo, A. Edelstein, S.L. Byrne, N.G. James, E.D. Roush, C.A. Fierke, C.E. Bobst, I.A. Kaltashov, and M.A. Daugherty, *Evolution reversed: The ability to bind iron restored to the N-lobe of the murine inhibitor of carbonic anhydrase by strategic mutagenesis.* Biochemistry-US, 2008. **47**(37): 9847-9855.
 132. Evans, R.W. and J. Williams, *Studies of the binding of different iron donors to human serum transferrin and isolation of iron-binding fragments from the N- and C-terminal regions of the protein.* Biochem. J., 1978. **173**(2): 543-552.
 133. Brock, J.W., D.J. Hinton, W.E. Cotham, T.O. Metz, S.R. Thorpe, J.W. Baynes, and J.M. Ames, *Proteomic analysis of the site specificity of glycation and carboxymethylation of ribonuclease.* J. Proteome Res., 2003. **2**(5): 506-513.
 134. Fujimoto, S., N. Kawakami, and A. Ohara, *Nonenzymatic glycation of transferrin: decrease of iron-binding capacity and increase of oxygen radical production.* Biol. Pharm. Bull., 1995. **18**(3): 396-400.

135. Luevano-Contreras, C. and K. Chapman-Novakofski, *Dietary advanced glycation end products and aging*. *Nutrients*, 2010. **2**(12): 1247-1265.
136. Baynes, J.W., N.G. Watkins, C.I. Fisher, C.J. Hull, J.S. Patrick, M.U. Ahmed, J.A. Dunn, and S.R. Thorpe, *The Amadori product on protein: structure and reactions*. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 1989. **304**: 43-67.
137. Venkatraman, J., K. Aggarwal, and P. Balaram, *Helical peptide models for protein glycation: proximity effects in catalysis of the Amadori rearrangement*. *Chem. Biol.* (Cambridge, MA, U. S.), 2001. **8**(7): 611-625.
138. Iberg, N. and R. Fluckiger, *Nonenzymatic glycosylation of albumin in vivo. Identification of multiple glycosylated sites*. *J. Biol. Chem.*, 1986. **261**(29): 13542-13545.
139. Messori, L., G. DalPoggetto, R. Monnanni, and J. Hirose, *The pH dependent properties of metallothioneins: a comparative study*. *Biomaterials*, 1997. **10**(4): 303-313.
140. Schlabach, M.R. and G.W. Bates, *The synergistic binding of anions and Fe³⁺ by transferrin. Implications for the interlocking sites hypothesis*. *J. Biol. Chem.*, 1975. **250**(6): 2182-2188.
141. Zak, O., K. Ikuta, and P. Aisen, *The synergistic anion-binding sites of human transferrin: chemical and physiological effects of site-directed mutagenesis*. *Biochemistry-US*, 2002. **41**(23): 7416-7423.
142. Kurokawa, H., B. Mikami, and M. Hirose, *Crystal Structure of Diferric Hen Ovitransferrin at 2.4 Å Resolution*. *J. Mol. Biol.*, 1995. **254**(2): 196-207.
143. Kurokawa, H., J.C. Dewan, B. Mikami, J.C. Sacchettini, and M. Hirose, *Crystal Structure of Hen Apo-ovotransferrin: Both lobes adopt an open conformation upon loss of iron*. *J. Biol. Chem.*, 1999. **274**(40): 28445-28452.
144. Jeffrey, P.D., M.C. Bewley, R.T. MacGillivray, A.B. Mason, R.C. Woodworth, and E.N. Baker, *Ligand-induced conformational change in transferrins: crystal structure of the open form of the N-terminal half-molecule of human transferrin*. *Biochemistry-US*, 1998. **37**(40): 13978-13986.
145. MacGillivray, R.T.A., S.A. Moore, J. Chen, B.F. Anderson, H. Baker, Y.G. Luo, M. Bewley, C.A. Smith, M.E.P. Murphy, Y. Wang, A.B. Mason, R.C. Woodworth, G.D. Brayer, and E.N. Baker, *Two high-resolution crystal structures of the recombinant N-lobe of human transferrin reveal a structural change implicated in iron release*. *Biochemistry-US*, 1998. **37**(22): 7919-7928.
146. Calmettes, C., J. Alcantara, R.H. Yu, A.B. Schryvers, and T.F. Moraes, *The structural basis of transferrin sequestration by transferrin-binding protein B*. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2012. **19**(3): 358-360.
147. Halbrooks, P.J., A.M. Giannetti, J.S. Klein, P.J. Bjorkman, J.R. Larouche, V.C. Smith, R.T. MacGillivray, S.J. Everse, and A.B. Mason, *Composition of pH-sensitive triad in C-lobe of human serum transferrin. Comparison to sequences of ovotransferrin and lactoferrin provides insight into functional differences in iron release*. *Biochemistry-US*, 2005. **44**(47): 15451-15460.
148. Austin, G.E., R.H. Mullins, and L.G. Morin, *Non-enzymic glycation of individual plasma proteins in normoglycemic and hyperglycemic patients*. *Clin. Chem.*, 1987. **33**(12): 2220-2224.

11. Anexos

Anexo 1 – Tabelas das pesquisas bioinformáticas dos dados de MS/MS

Tabela 1 - Pesquisa bioinformática recorrendo ao algoritmo turbo-sequest (Sequest-Bioworks 3.1; Thermo Scientific) para as amostras analisadas por nanoHPLC-ESI-Ion Trap-MS/MS apos incubação com 0, 10, 100, 500 mM de D-glucose por 7 dias

TRFE_HUMAN Serotransferrin OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=3											
D-glucose na incubação (mM)	Taxa de cobertura	Péptidos Modificados	Posição	Massa detetada	Carga	P (pep)	XC	ΔCn	Sp	RSp	Ions
0	91,12%	K.DK'SK^EFQLFSSPHGK.D	277-291	1914,92096	3	3,01E-02	1,93	0,04	382,4	1	20/84
		K.DK^SK'EFQLFSSPHGK.D	277-291	1914,92096	3	2,72E-01	1,86	0,92	314,6	2	18/84
10	90,83%	K.DK'SK^EFQLFSSPHGK.D	277-291	1914,92096	3	1,07E-01	2,18	0,09	319,0	1	18/84
		K.DK^SK'EFQLFSSPHGK.D	277-291	1914,92096	3	6,61E-01	1,97	0,74	310,1	2	18/84
100.00	88,83%	K.DGAGDVAFVK'HSTIFENLANK.A	197-217	2341,14477	3	2,10E-09	4,99	0,58	1293,9	1	39/120
		K.DK'SK^EFQLFSSPHGK.D	277-291	1914,92096	3	3,48E-03	1,98	0,12	280,1	1	17/84
		K.DK^SK'EFQLFSSPHGK.D	277-291	1914,92096	3	2,56E-02	1,80	0,05	317,0	1	18/84
		K.CLK~DGAGDVAFVK.H	194-206	1466,71730	3	4,13E-02	2,40	0,70	428,9	1	23/72
500	89,11%	K.CLK~DGAGDVAFVK.H	194-206	1466,71730	3	1,34E-01	2,28	0,68	519,5	1	24/72
		K.DGAGDVAFVK'HSTIFENLANK.A	197-217	2341,14477	2	5,45E-04	4,53	0,28	356,6	1	21/60
		K.DK'SK^EFQLFSSPHGK.D	277-291	1914,92096	3	1,94E-01	1,81	0,95	288,5	2	17/84
		K.DK^SK'EFQLFSSPHGK.D	277-291	1914,92096	3	2,66E-01	2,07	0,09	282,3	1	17/84
		K.DLLFK'DSAHGFLK.V	292-304	1598,82019	2	8,20E-02	3,11	0,14	417,0	1	16/36
		K.EDLIWELLNQAQEHFGK'DK.S	260-278	2421,17099	3	9,21E-05	3,27	0,05	465,3	1	29/108
		K.EFQLFSSPHGK'DLLFK.D	281-296	2001,01051	2	4,75E-03	4,17	0,64	474,6	1	20/45
		K.GDVAFVK'HQTVPQNTGGK.N	528-545	1990,99699	3	1,65E-05	3,96	0,74	1046,5	1	35/102
		K.SASDLTWDNLK'GK.K	435-447	1542,74233	2	2,54E-01	3,24	0,06	348,0	1	16/36
		R.MDAK'MYLGYEYVTAIR.N	309-324	2085,98432	2	2,74E-04	1,44	0,92	179,3	1	14/45
- Com ^ estão representadas as lisinas modificadas por formação do aduto frutose-lisina, com ^ o aduto carboxi-etil-lisina, com ~ o aduto frutose-lisina-H ₂ O											

Tabela 2 - Pesquisa bioinformática recorrendo ao algoritmo turbo-sequest (Sequest-Bioworks 3.1; Thermo Scientific) para as amostras analisadas por nano-HPLC-ESI-Ion Trap-MS/MS apos incubação com 0, 10, 100, 500 mM de D-glucose por 14 dias

TRFE_HUMAN Serotransferrin OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=3											
D-glucose na incubação (mM)	Taxa de cobertura	Péptido	Posição	Massa detectada	Carga	P (pep)	XC	ΔCn	Sp	RSp	Ions
0	93,27 %	K.DK'SK^EFQLFSSPHGK.D	277-291	1914.92096	3	9,05E-02	1,97	0,04	317,9	1	18/84
		K.DK^SK'SK^EFQLFSSPHGK.D	277-291	1914.92096	3	5,90E-01	1,88	0,88	288,9	2	17/84
10	89,11%	K.DK'SK^EFQLFSSPHGK.D	277-291	1914.92096	3	2,34E-02	1,99	0,10	328,8	1	19/84
		K.DK^SK'SK^EFQLFSSPHGK.D	277-291	1914.92096	3	7,79E-01	1,84	0,94	254,0	2	16/84
100.00	89,54%	K.K~DSGFQMNQLR.G	103-113	1485.69740	3	6,96E-01	3,60	0,79	1158,6	1	27/60
		K.DK'SK^EFQLFSSPHGK.D	277-291	1914.92096	3	7,95E-01	1,87	0,87	238,4	2	15/84
		K.DK^SK'SK^EFQLFSSPHGK.D	277-291	1914.92096	3	1,70E-01	2,02	0,07	326,3	1	18/84
		K.DSSLCK'LCMGSGNLNCEPNNK.E	491-511	2388.05216	3	2,67E-01	1,13	0,12	167,5	1	18/120
		K.GDVAFAVK'HQTVPQNTGGK.N	528-545	1990.99699	3	2,10E-06	4,74	0,68	723,3	1	32/102
500	92,69%	K.K^DSGFQMNQLR.G	103-113	1431.66740	2	4,39E-07	3,84	0,87	742,0	1	19/30
		K.DGAGDVAFAVK'HSTIFENLANK.A	197-217	2341.14477	3	2,05E-09	5,23	0,56	1262,1	1	37/120
		K.EDLIWELLNQAQEHFGK'DK.S	260-278	2421.17099	3	6,00E-04	3,48	0,10	378,6	1	27/108
		K.DK'SK^EFQLFSSPHGK.D	277-291	1914.92096	3	3,28E-01	1,72	0,86	279,5	2	17/84
		K.DK^SK'SK^EFQLFSSPHGK.D	277-291	1914.92096	3	3,77E-02	1,90	0,09	306,2	1	18/84
		K.DLLFK'DSAHGFLK.V	292-304	1598.82019	2	1,90E-06	3,34	0,12	744,5	1	18/36
		R.MDAK'MYLGYYEYVTAIR.N	309-324	2031.95432	2	3,29E-04	3,35	0,70	559,8	1	17/45
		K.SASDLTWDNLK'GK.K	435-447	1542.74233	2	8,94E-01	3,33	0,14	270,9	1	15/36
		K.GDVAFAVK'HQTVPQNTGGK.N	528-545	1990.99699	3	1,73E-04	3,84	0,46	620,0	1	29/102
		R.NTYEK'YLGEEYVK.A	645-657	1743.81008	2	4,63E-03	3,44	0,82	450,9	1	17/36
		K.YLGEEYVK'AVGNLR.K	649-663	1718.87368	2	1,47E-04	3,09	-	307,1	1	15/39

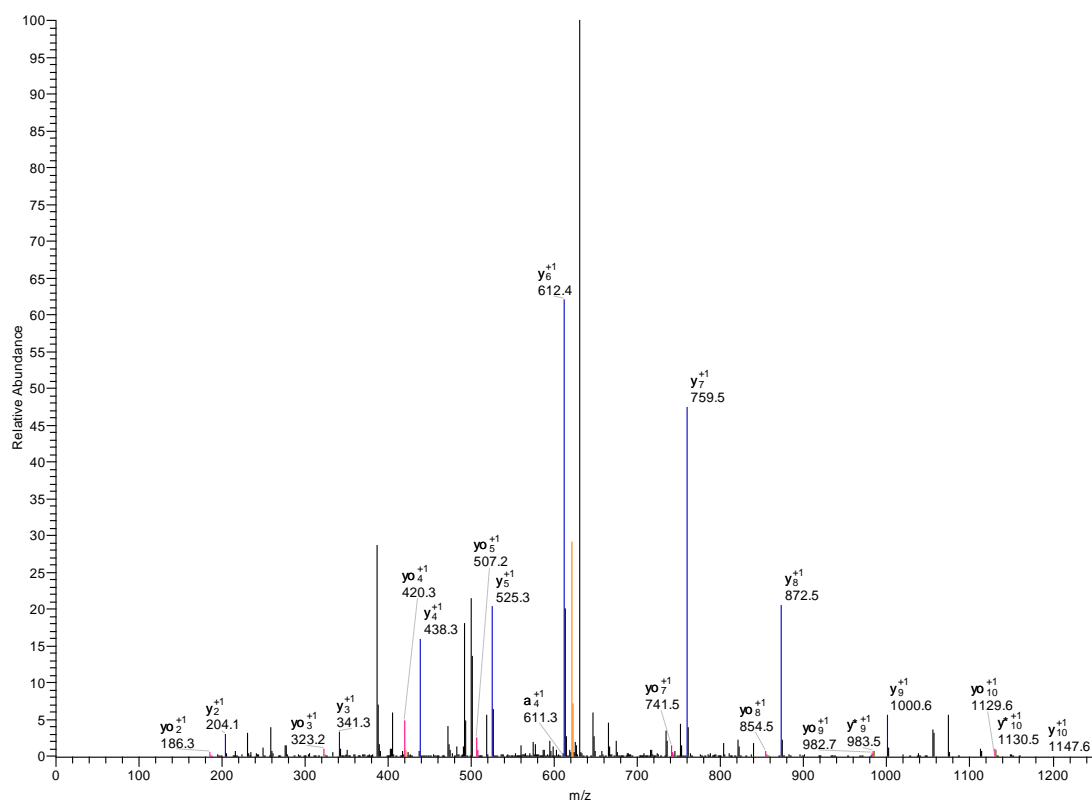
- Com ^ estão representadas as lisinas modificadas por formação do aduto frutose-lisina, com ^ o aduto carboxi-etil-lisina, com ~ o aduto frutose-lisina-H₂O

Anexo 2 – Espectros MS tandem dos péptidos modificados por glicação

Espectros exemplificativos dos péptidos modificados por glicação obtidos por nano-HPLC-ESI-Ion Trap-MS/MS apos incubação com 0, 10, 100, 500 mM de D-glucose por 7 e 14 dias.

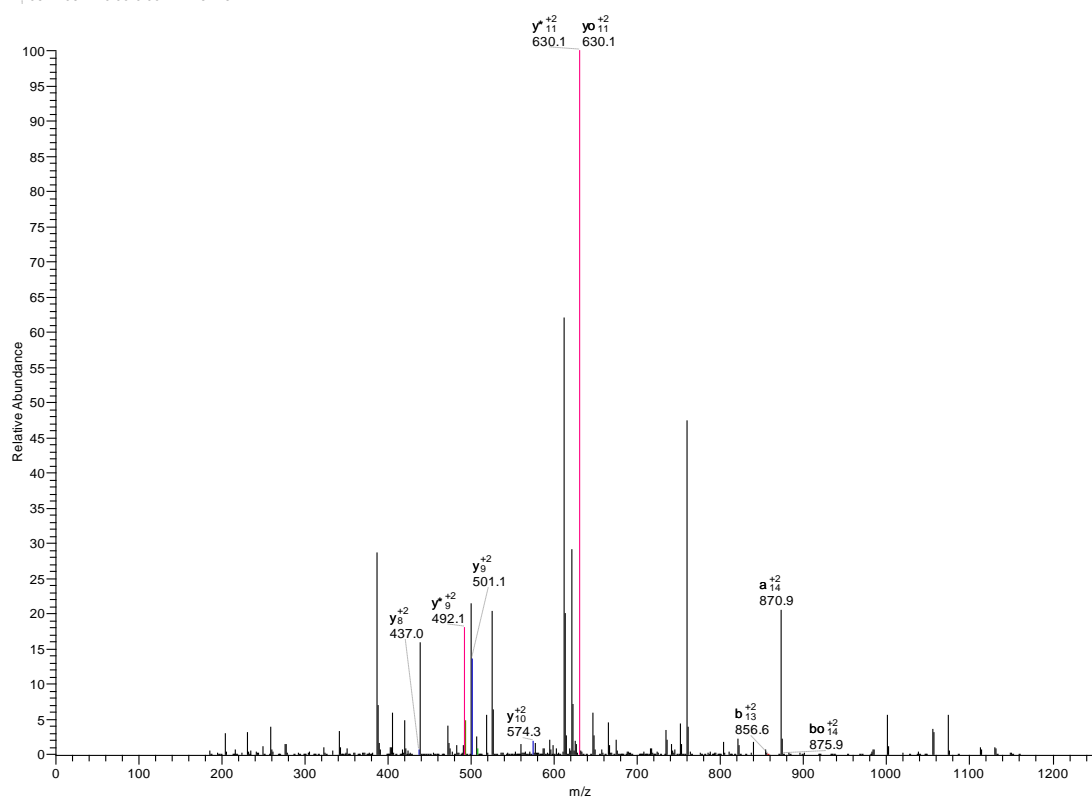
Péptido: K.DK'SK^EFQLFSSPHGK.D
Carga: +1

#1106-1106 RT:0.00-0.00 NL: 2.37E5



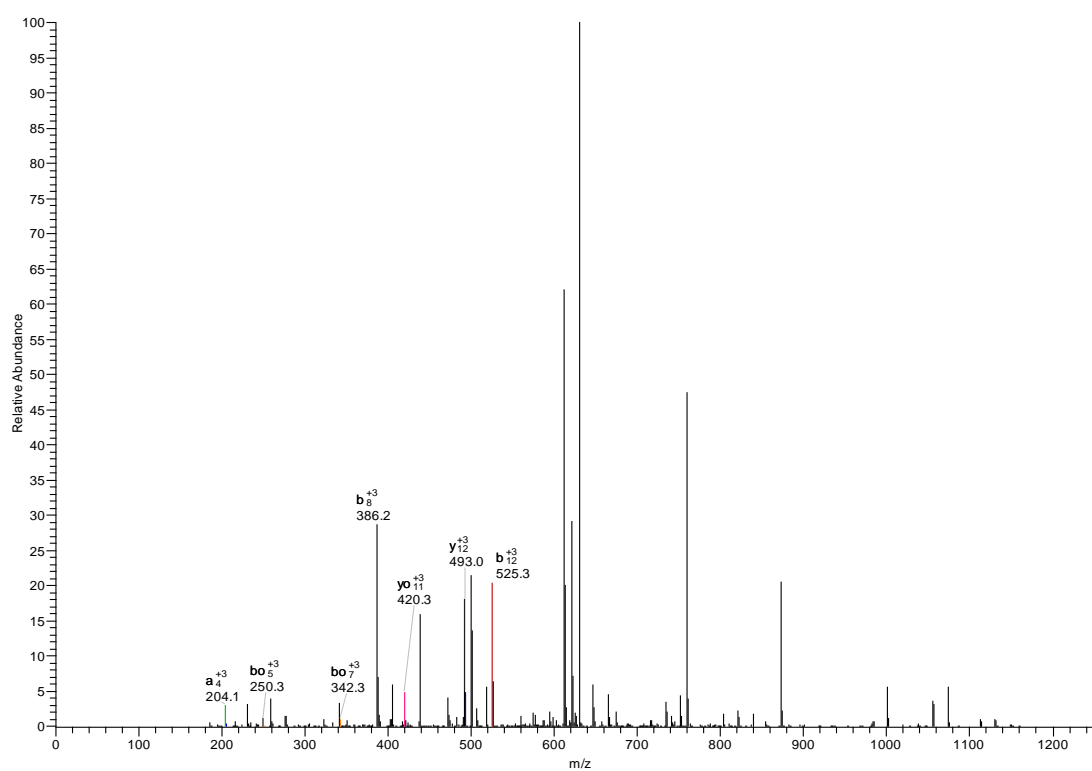
Carga 2+

#1106-1106 RT:0.00-0.00 NL: 2.37E5



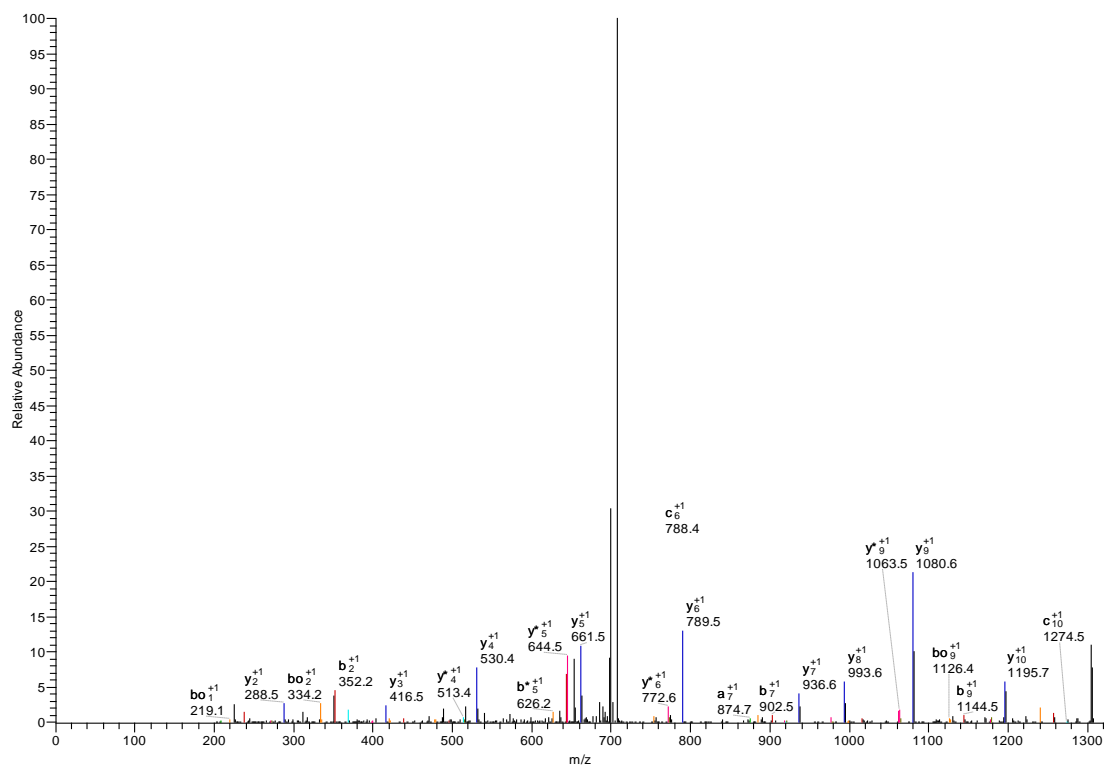
Carga 3+

#1106-1106 RT:0.00-0.00 NL: 2.37E5



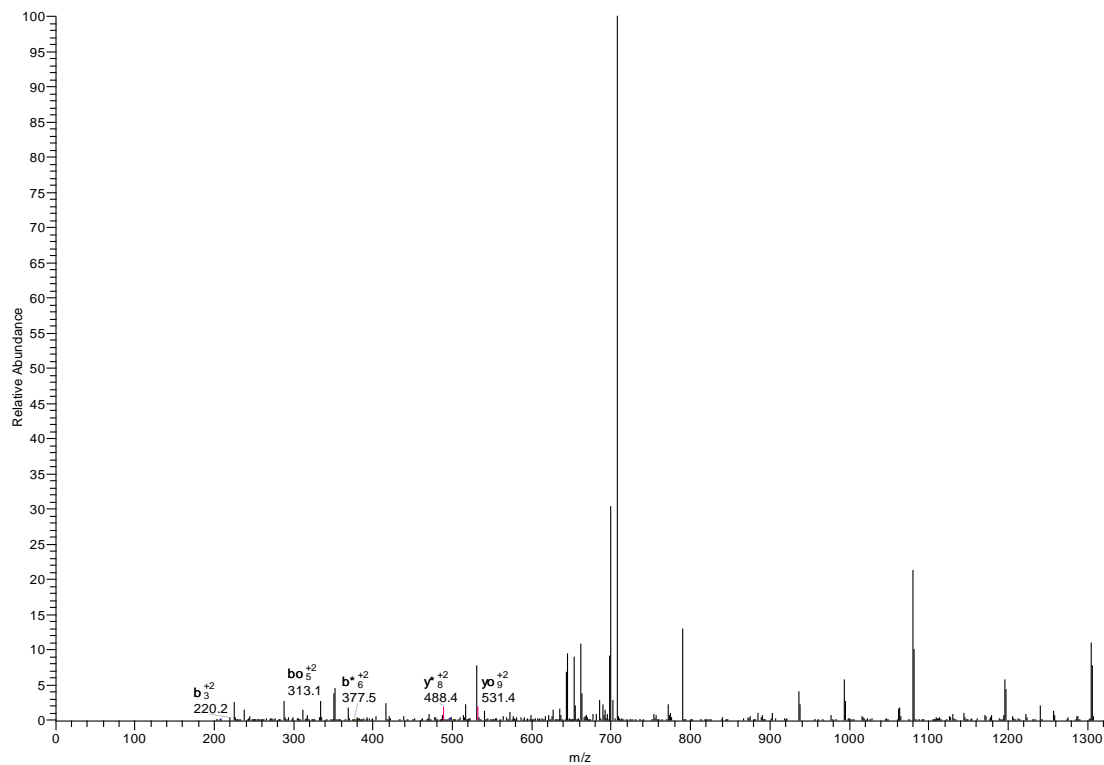
Péptido K.K~DSGFQMNQLR.G
Carga: 1+

#927-927 RT:20.92-20.92 NL: 4.56E4



Carga: 2+

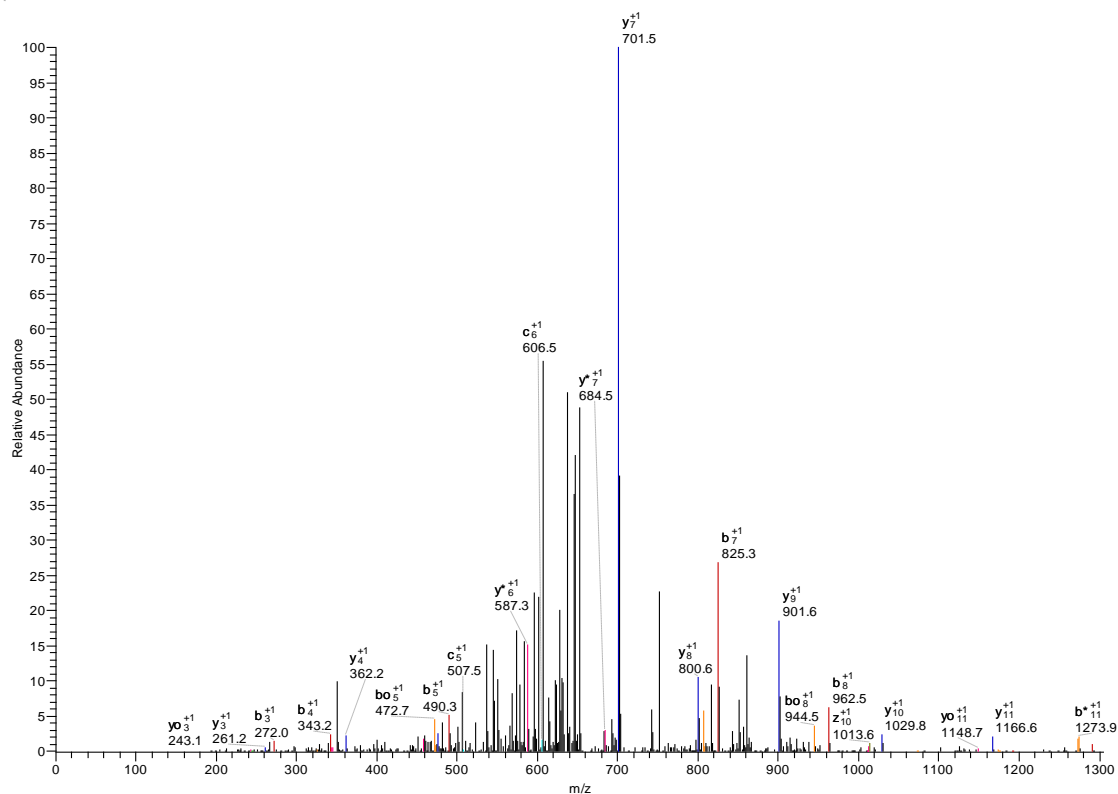
#927-927 RT:20.92-20.92 NL: 4.56E4



Péptido: K.GDVAFVK'HQTVPQNTGGK.N

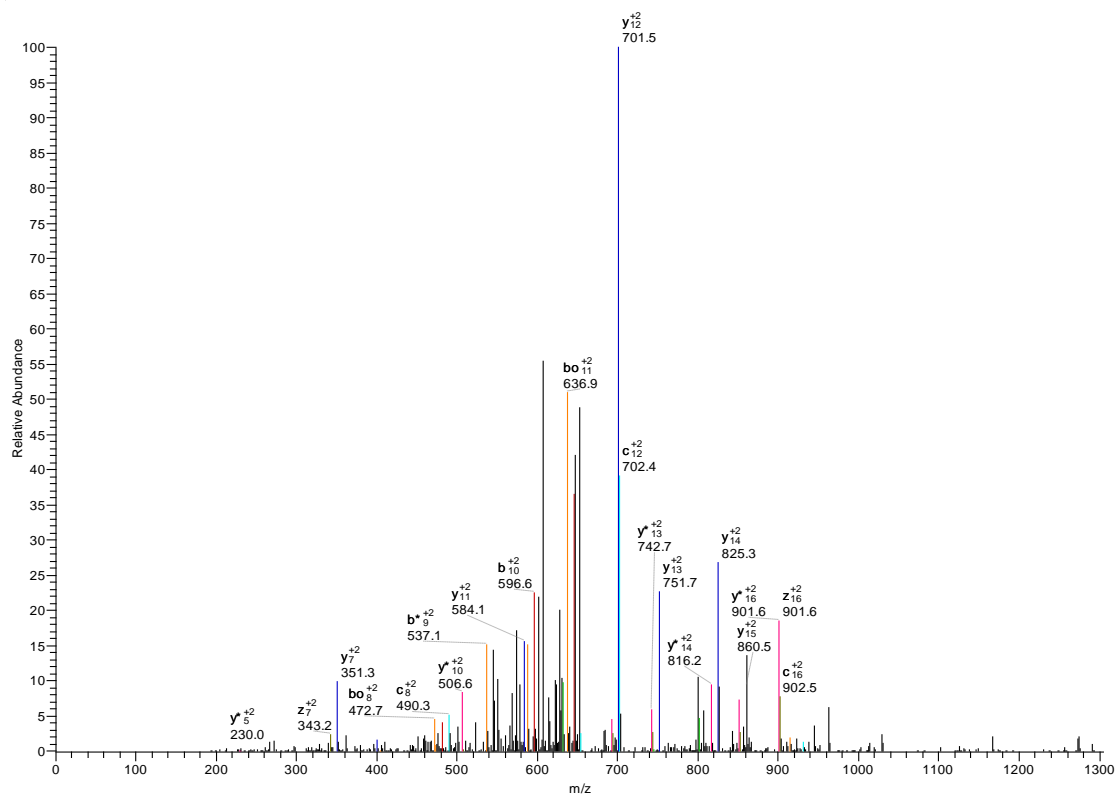
Carga: 1+

#729-729 RT:17.38-17.38 NL: 4.72E4



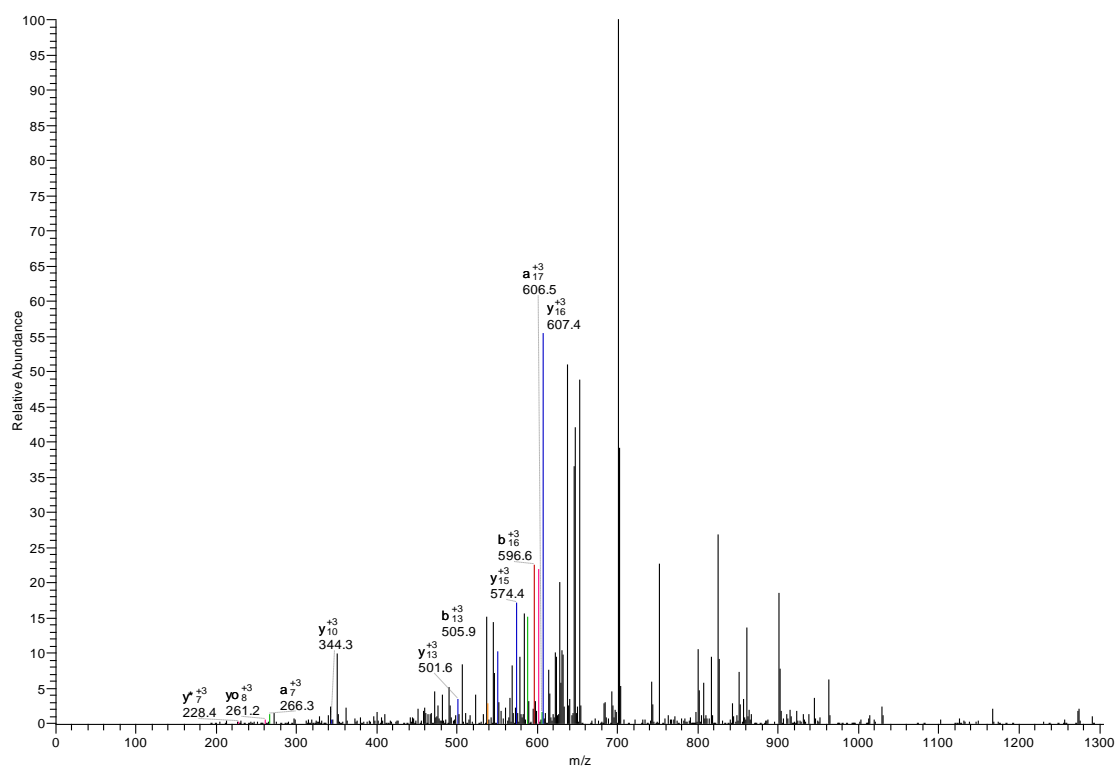
Carga: 2+

#729-729 RT:17.38-17.38 NL: 4.72E4



Carga: 3+

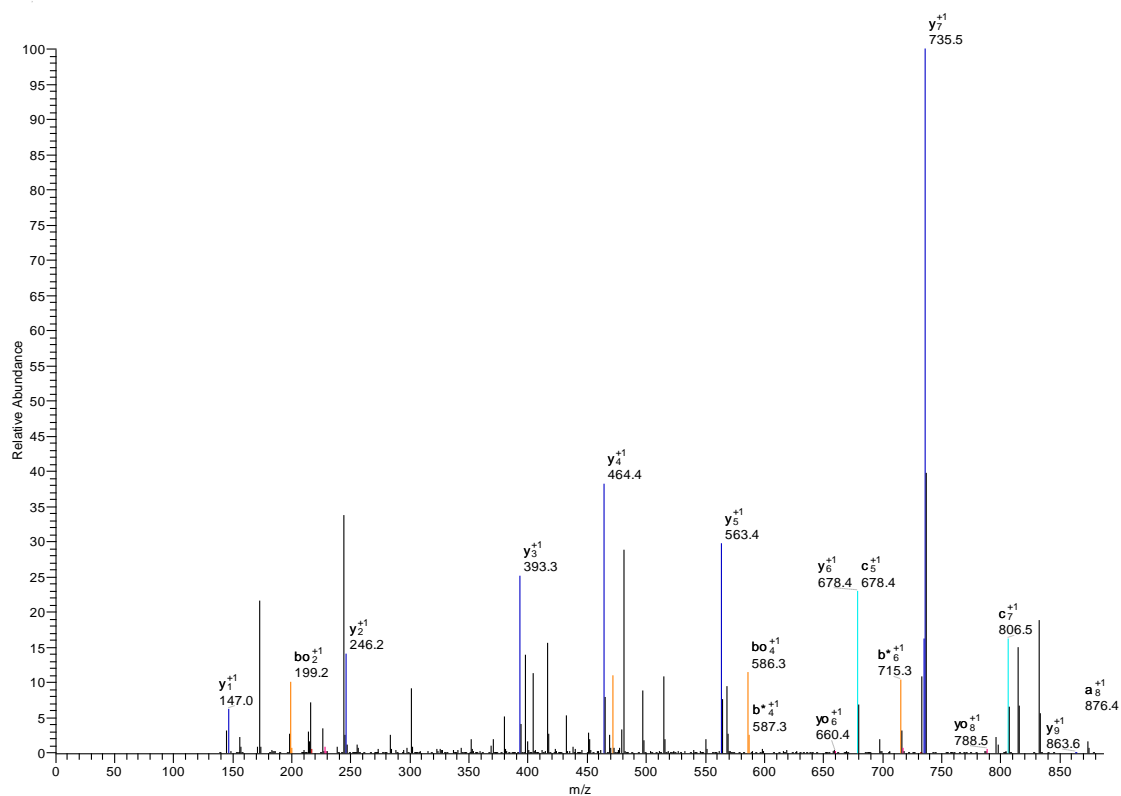
#729-729 RT:17.38-17.38 NL: 4.72E4



Péptido: K.DGAGDVAFVK'HSTIFENLANK.A

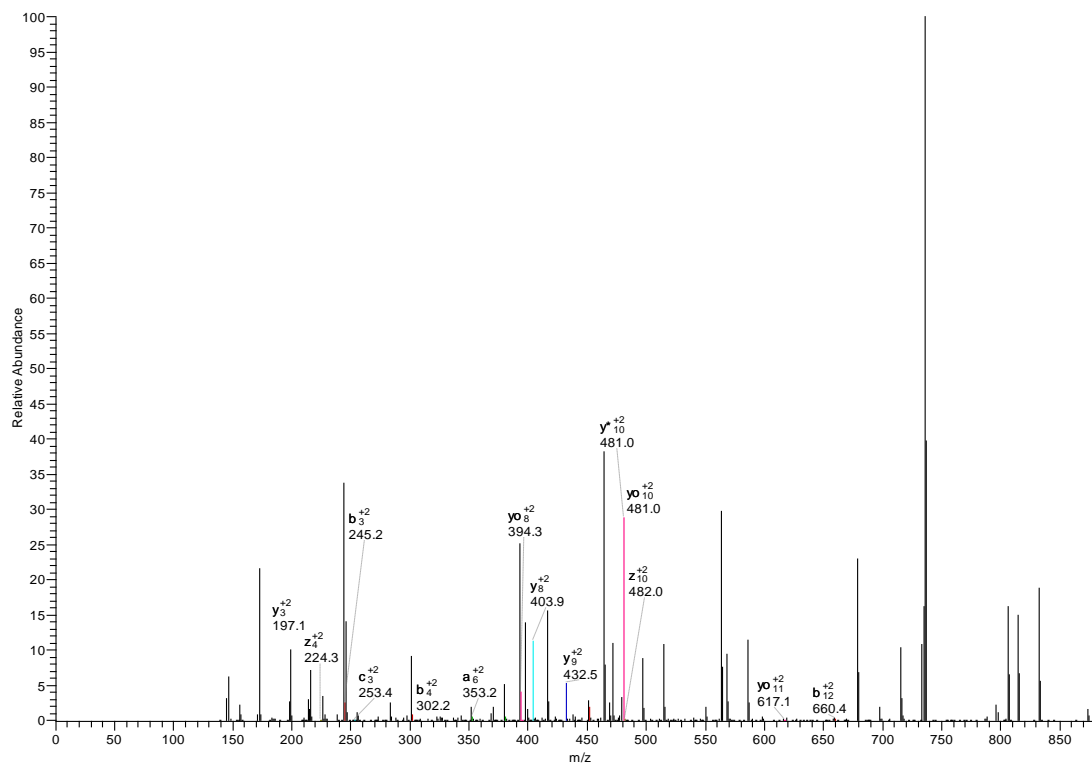
Carga: 1+

#982-982 RT:0.00-0.00 NL: 8.24E4



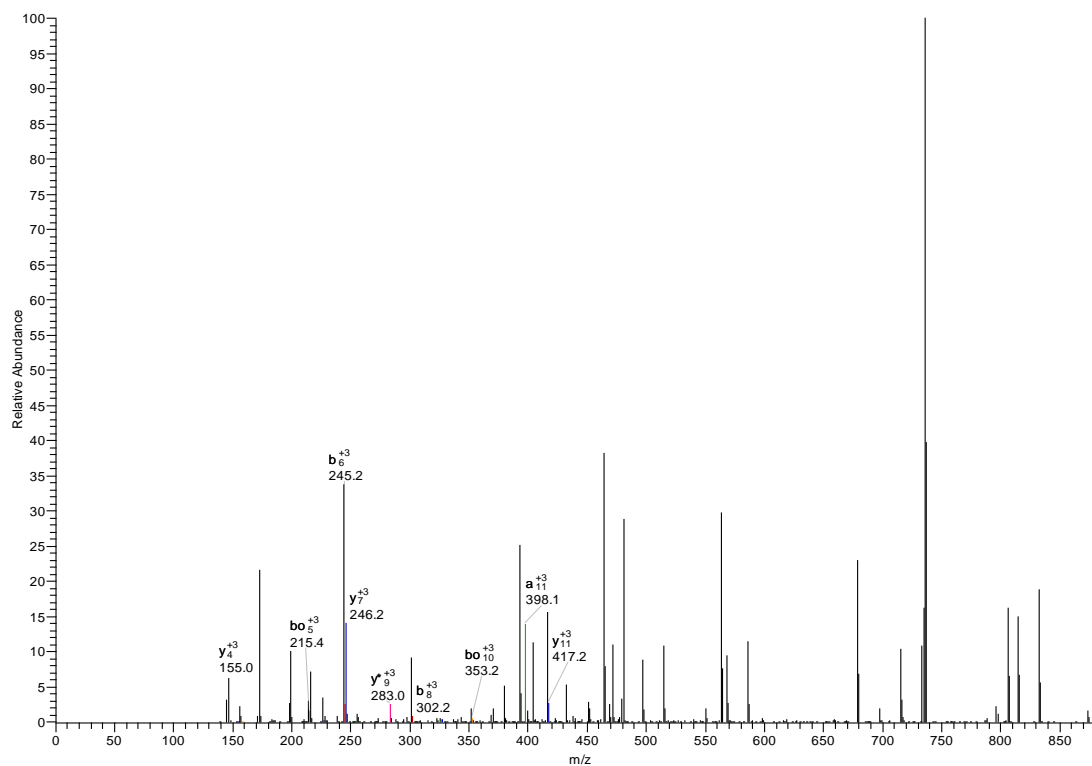
Carga: 2+

#982-982 RT:0.00-0.00 NL: 8.24E4



Carga: 3+

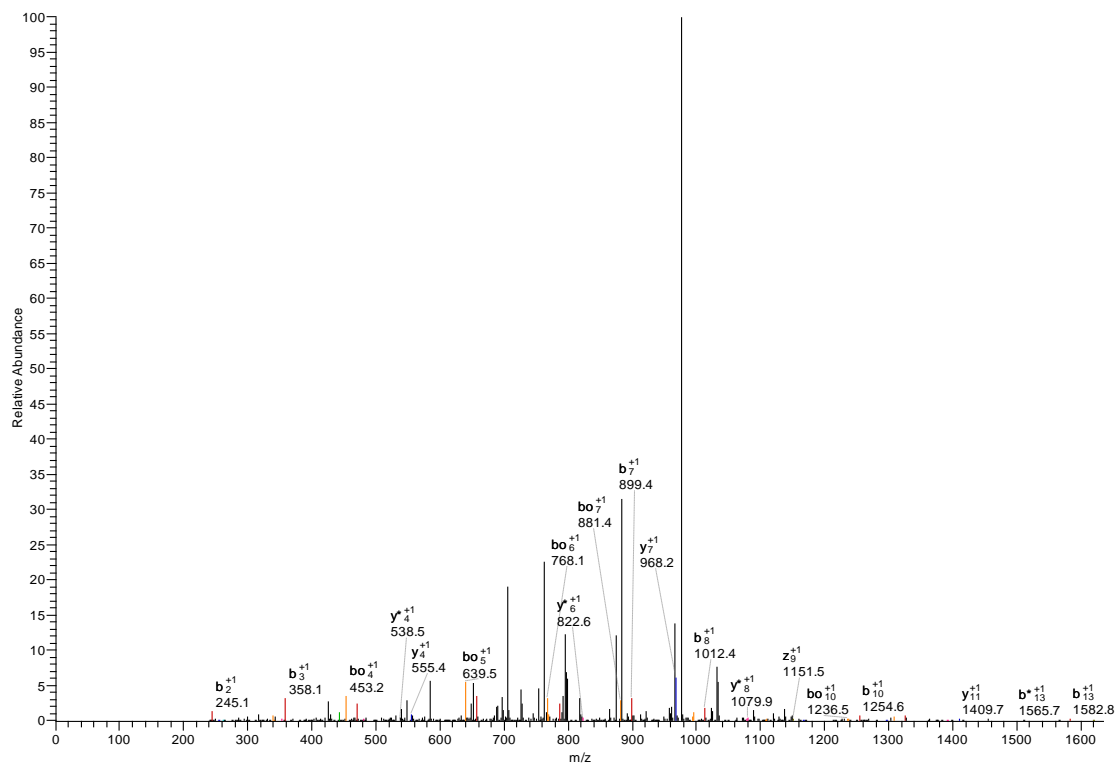
#982-982 RT:0.00-0.00 NL: 8.24E4



Péptido: K.EDLIWELLNQAQEHLFGK'DK.S

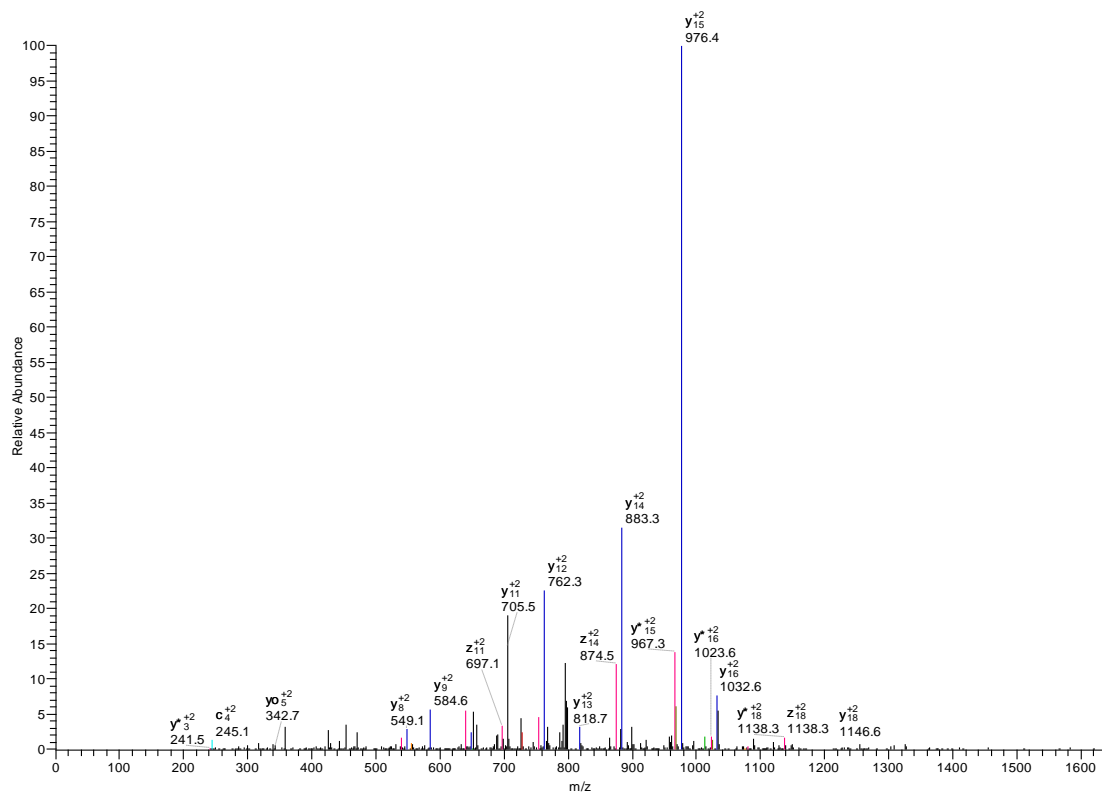
Carga: 1+

#1608-1608 RT:0.00-0.00 NL: 9.88E3



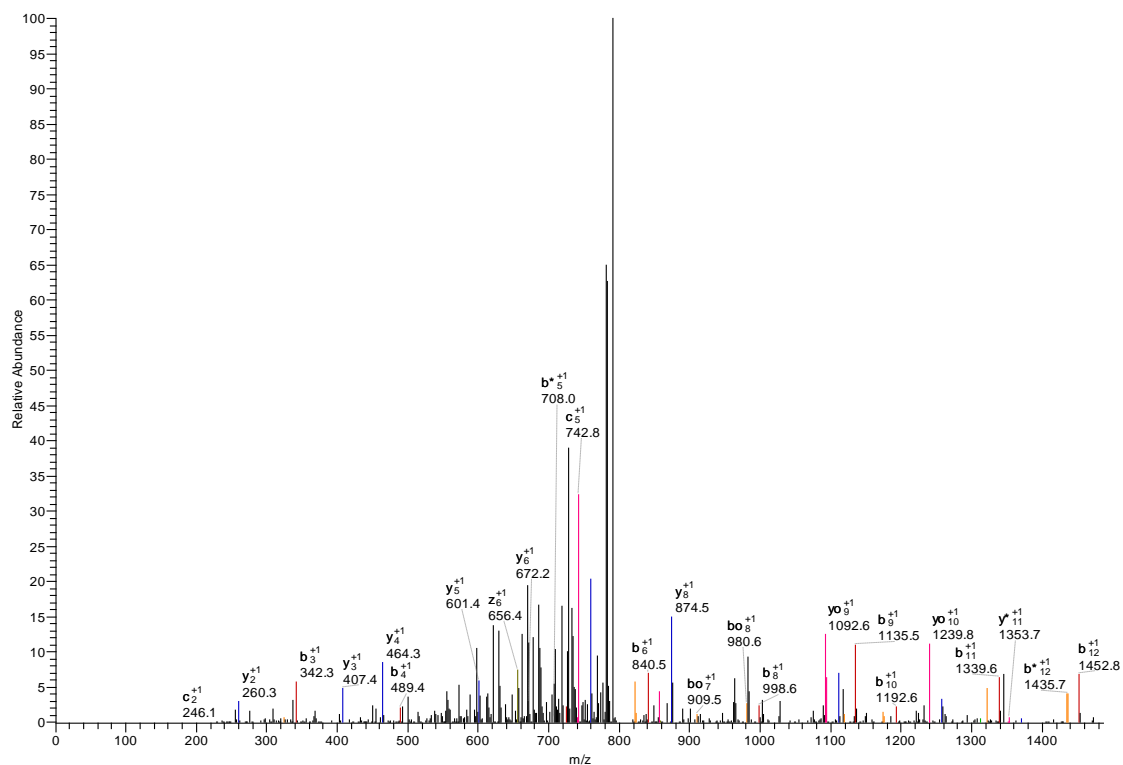
Carga: 2+

#1608-1608 RT:0.00-0.00 NL: 9.88E3



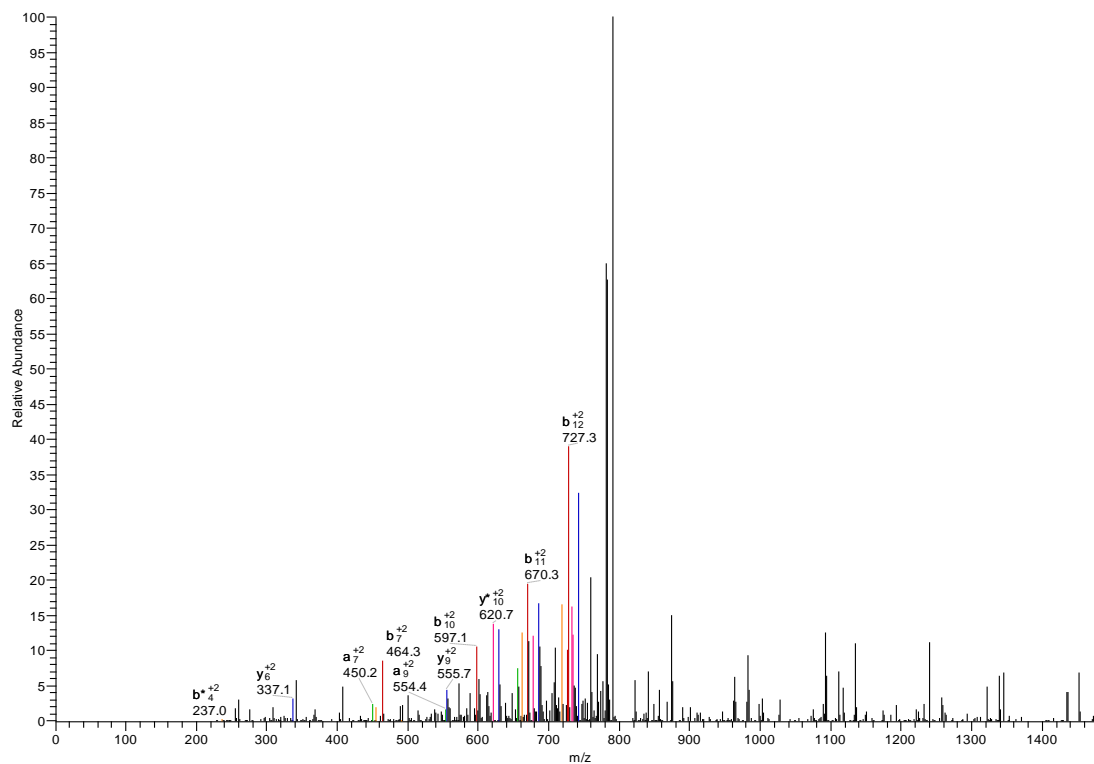
Péptido: K.DLLFK'DSAHGFLK.V
Carga: 1+

#1195-1195 RT:25.78-25.78 NL: 4.92E3



Carga: 2+

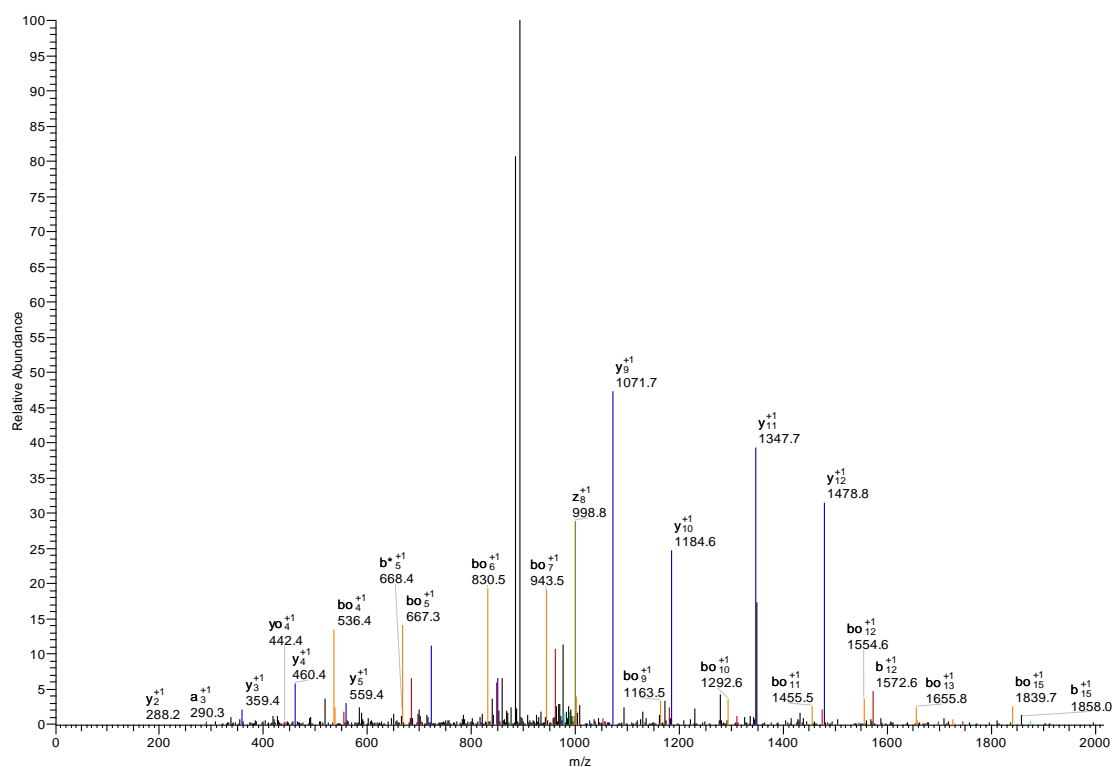
#1195-1195 RT:25.78-25.78 NL: 4.92E3



Péptido: R.MDAK'MYLGYEYVTAIR.N

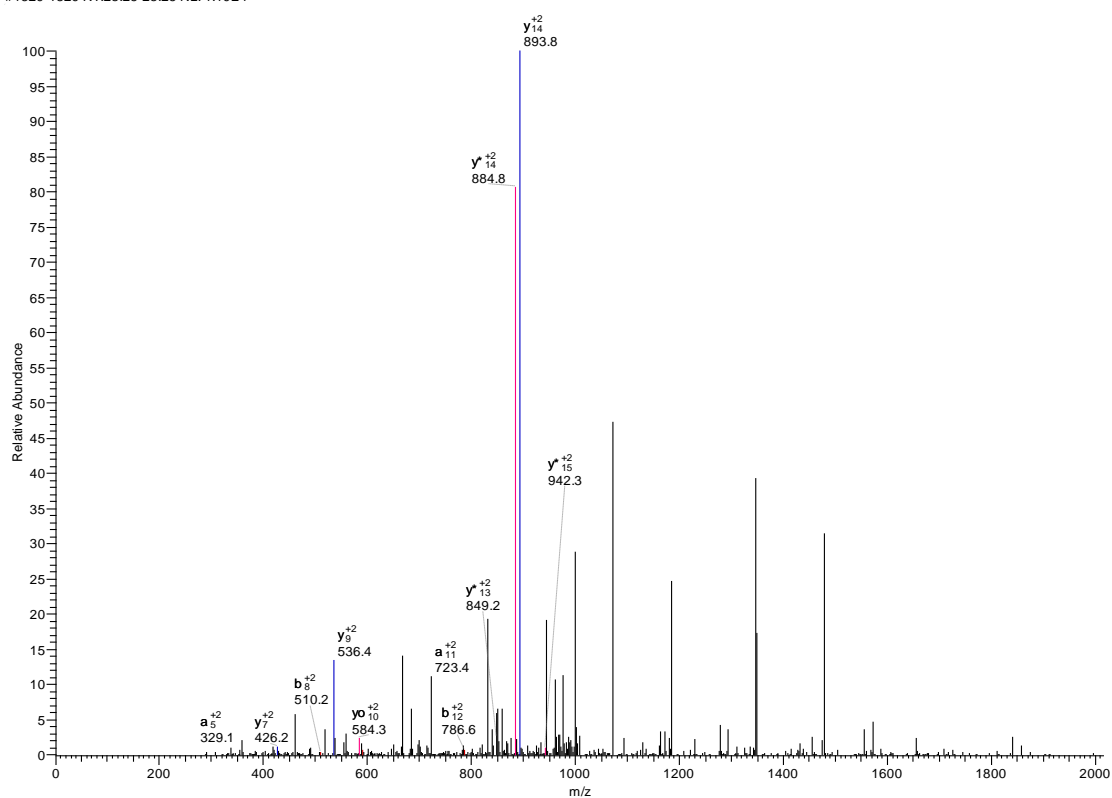
Carga: 1+

#1329-1329 RT:28.25-28.25 NL: 1.19E4



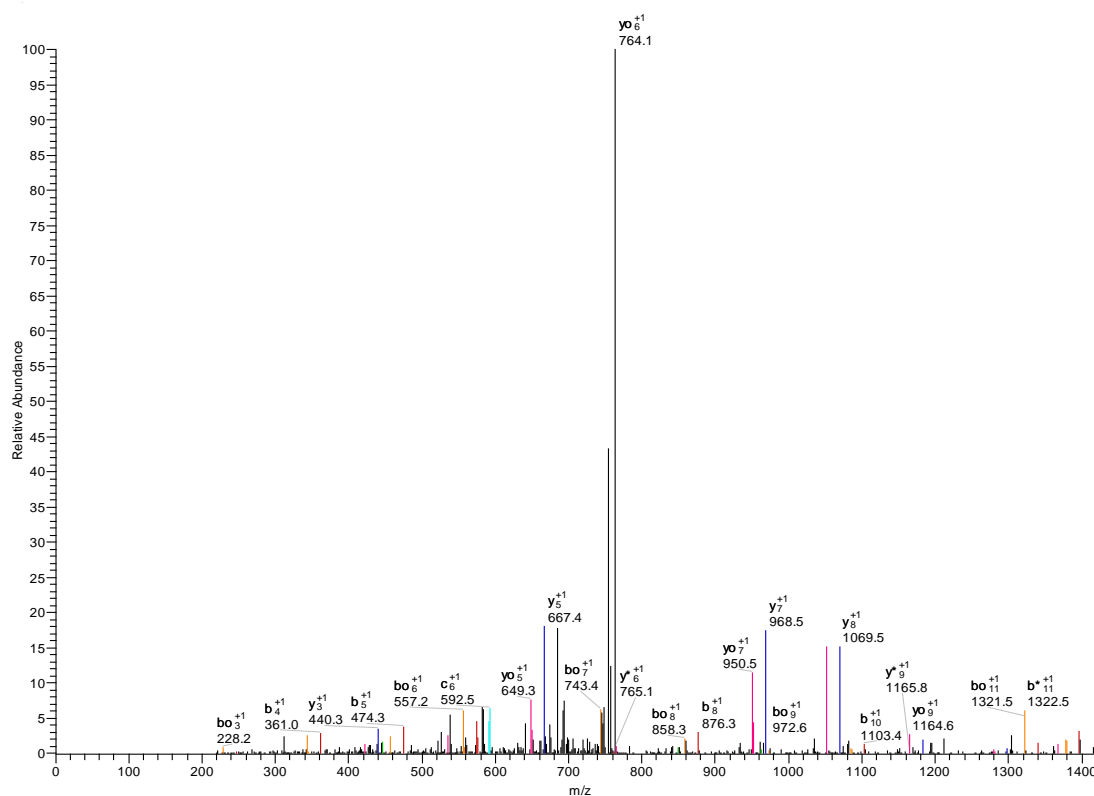
Carga: 2+

#1329-1329 RT:28.25-28.25 NL: 1.19E4



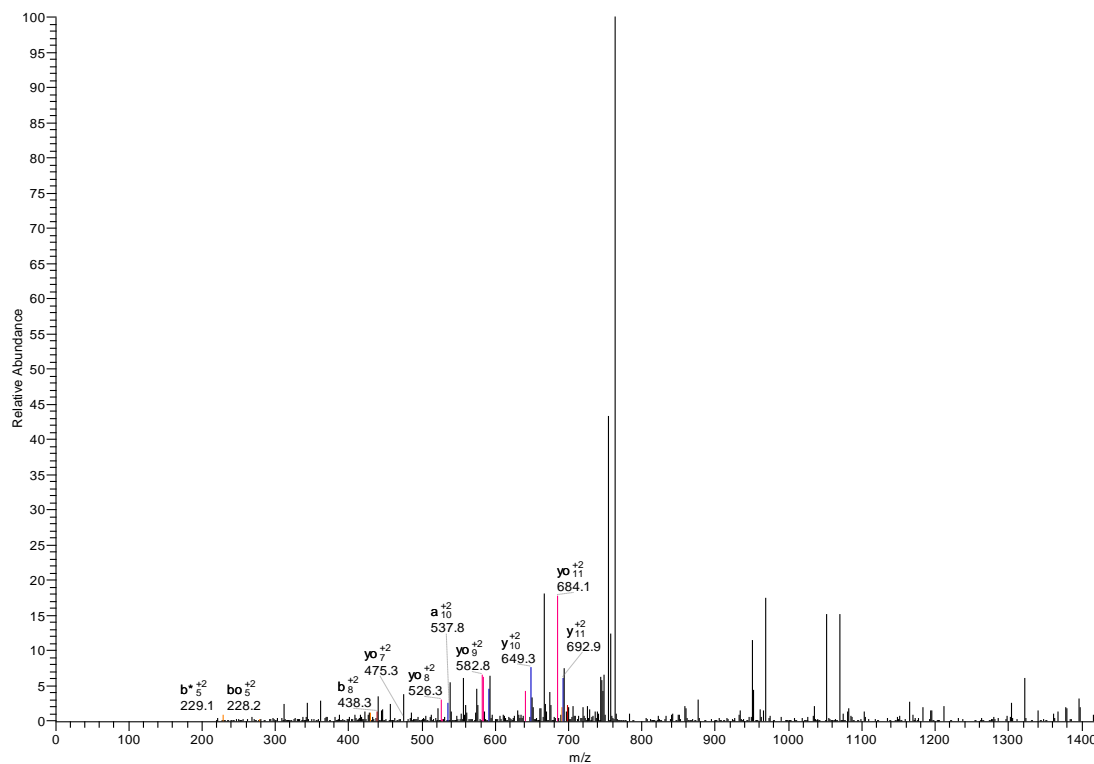
Péptido: K.SASDLTWDNLK'GK.K
Carga: 1+

#1034-1034 RT:22.86-22.86 NL: 1.75E4



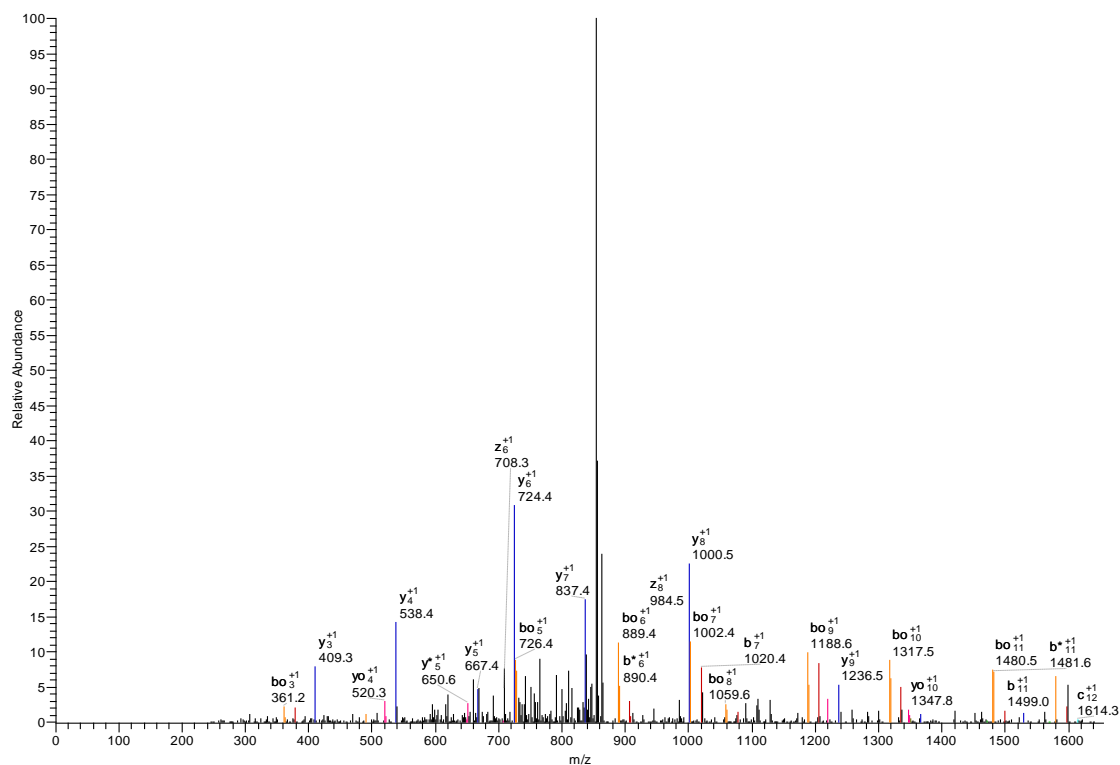
Carga: 2+

#1034-1034 RT:22.86-22.86 NL: 1.75E4



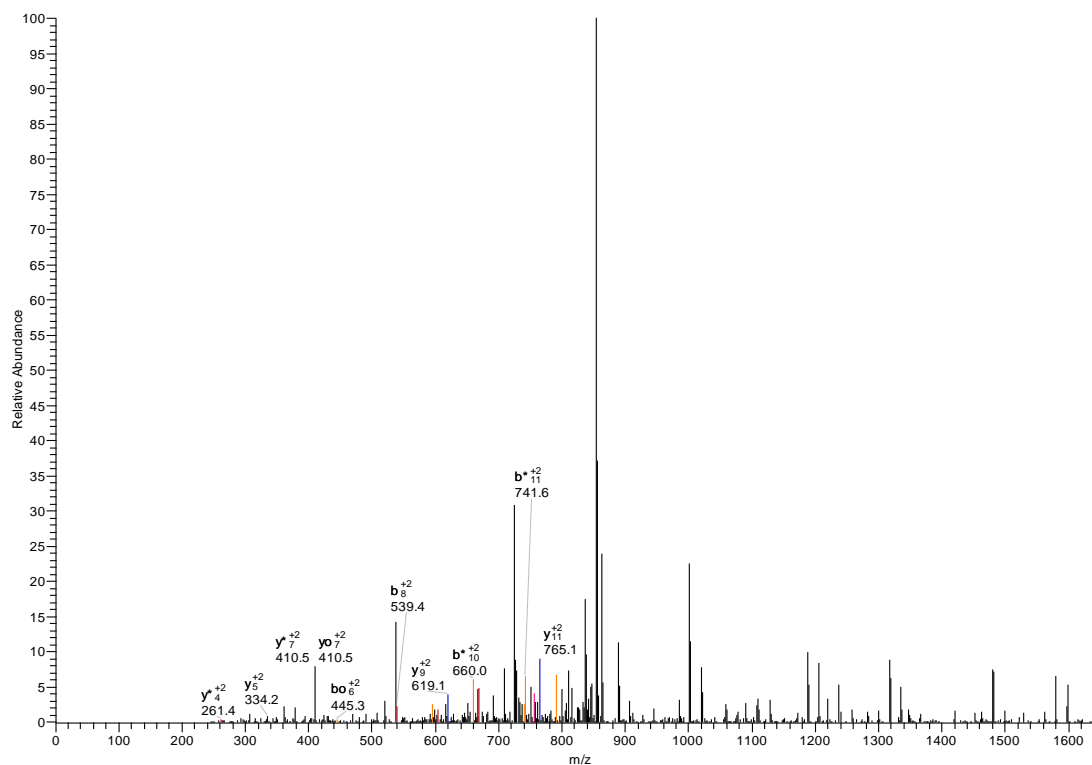
Péptido: R.NTYEK'YLGEEYVK.A
Carga: 1+

#1041-1041 RT:22.97-22.97 NL: 2.78E4



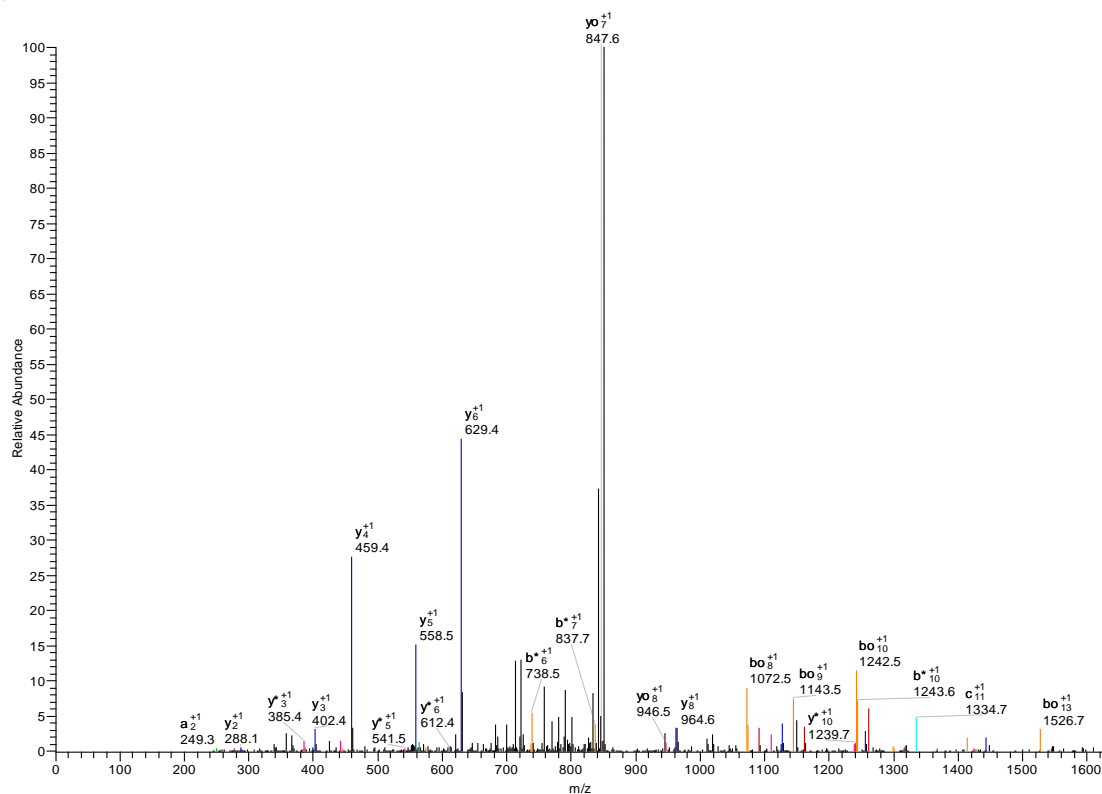
Carga: 2+

#1041-1041 RT:22.97-22.97 NL: 2.78E4



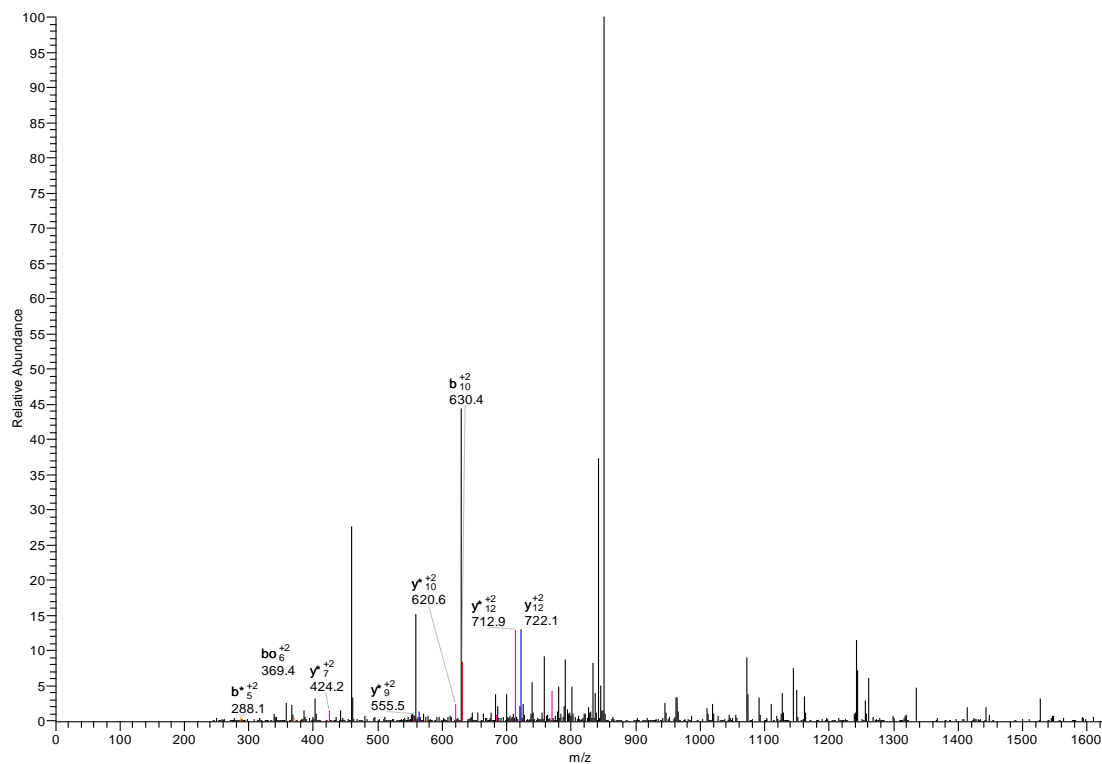
Péptido: K.YLGEEYVK'AVGNLR.K
Carga: 1+

#1281-1281 RT:27.36-27.36 NL: 6.62E4



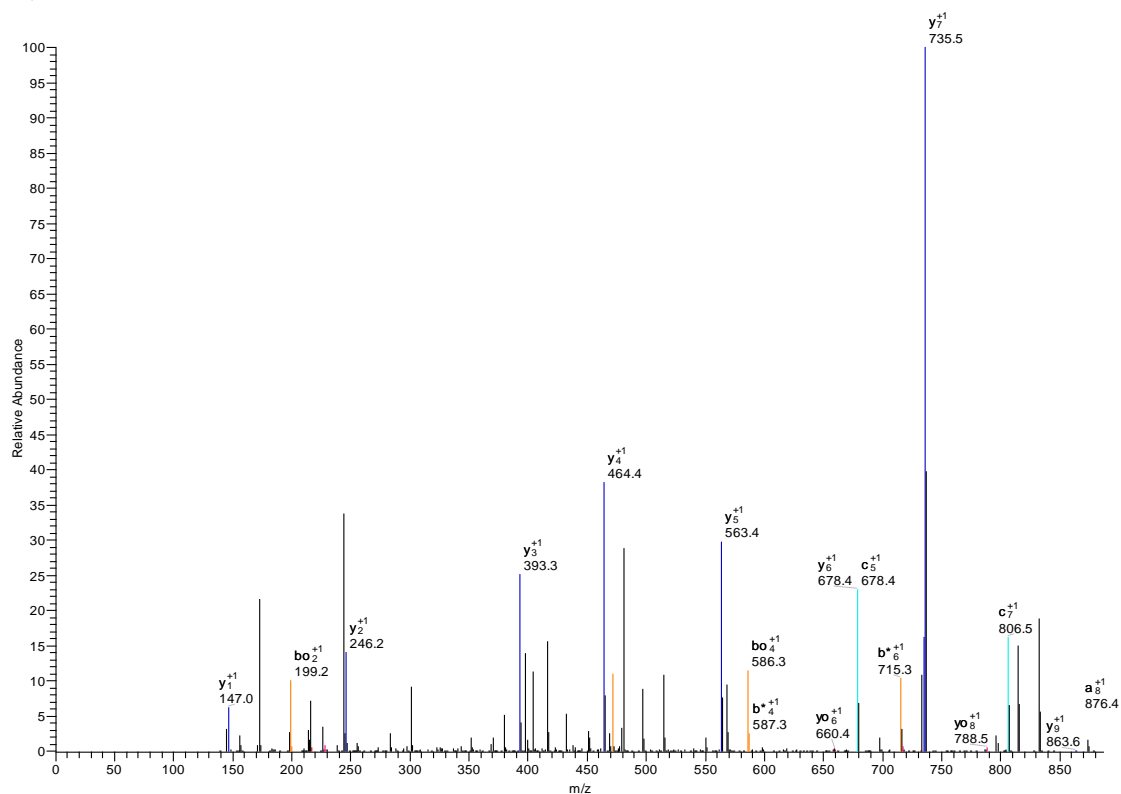
Carga: 2+

#1281-1281 RT:27.36-27.36 NL: 6.62E4



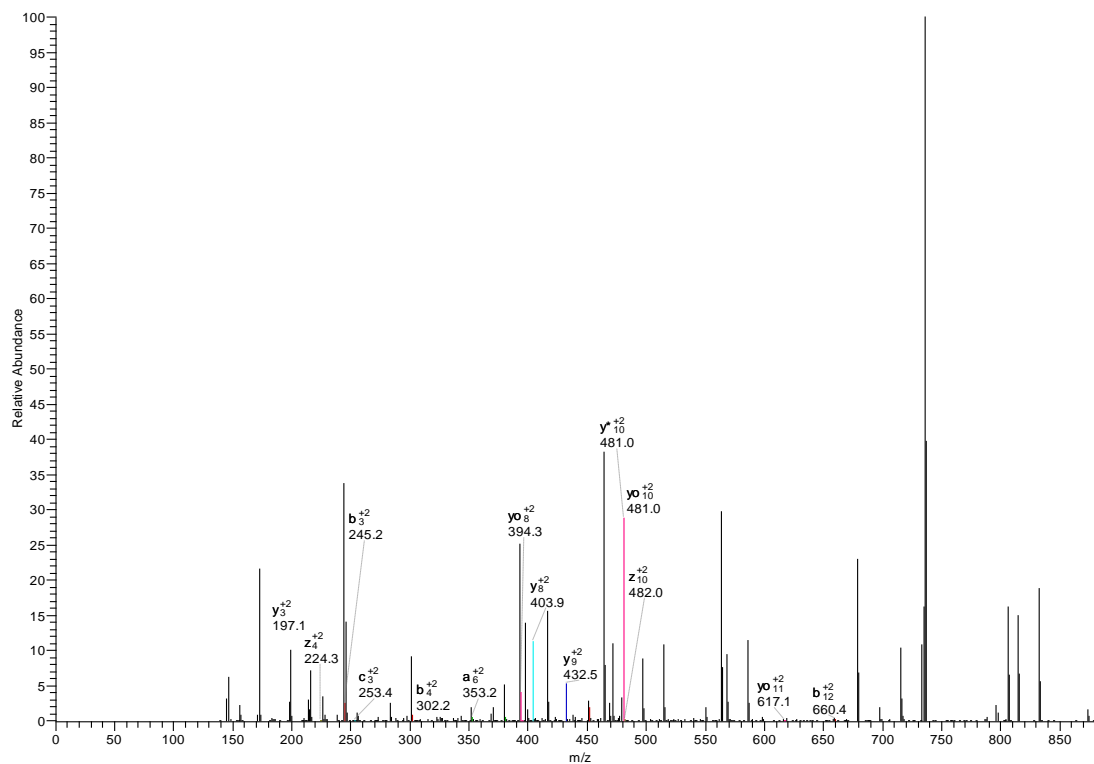
Péptido: K.CLK~DGAGDVAFVK.H
Carga: 1+

#982-982 RT:0.00-0.00 NL: 8.24E4



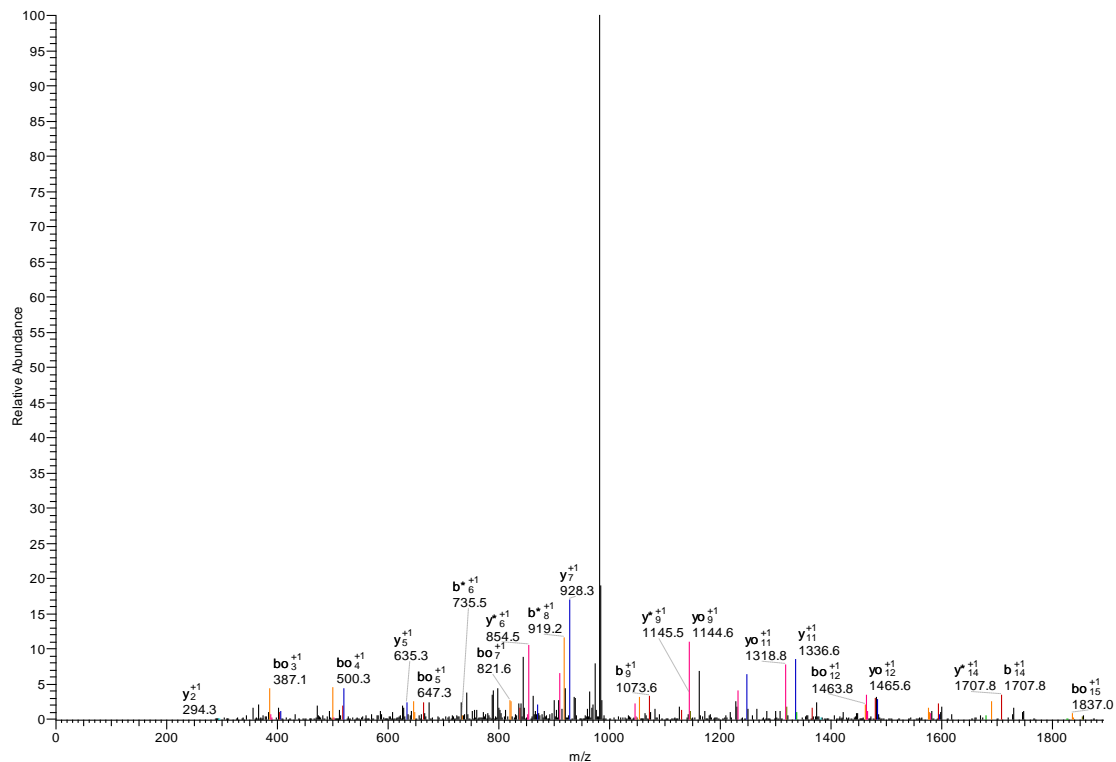
Carga: 2+

#982-982 RT:0.00-0.00 NL: 8.24E4



Péptido: K.EFQLFSSPHGK'DLLFK.D
Carga: 1+

#1301-1301 RT:27.73-27.73 NL: 5.42E3



Carga: 2+

#1301-1301 RT:27.73-27.73 NL: 5.42E3

